

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

**SPECIALITE – BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA CELLULE
ECOLE DOCTORALE 515 – COMPLEXITE DU VIVANT**

Laboratoire de biologie du développement, CNRS-UPMC UMR7622

Equipe de recherche Compartimentation et trafic intracellulaire des mRNPs

Présentée par
Mme Jessica AYACHE

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Dirigée par
Dr. Dominique WEIL et Dr. Michèle ERNOULT-LANGE

**Caractérisation des complexes contenant l'hélicase à motif
DEAD DDX6 dans les cellules humaines**

Soutenue publiquement le 8 septembre 2015, devant un jury composé de :

Pr. Frédéric DEVAUX	Président du jury
Dr. Catherine-Laure TOMASETTO	Rapporteur
Dr. Céline VERHEGGEN	Rapporteur
Dr. Hervé LE HIR	Examineur
Pr. Nancy STANDART	Examineur
Dr. Dominique WEIL	Directrice de thèse
Dr. Michèle ERNOULT-LANGE	Co-Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury. Au **Dr. Catherine Tomasetto** et au **Dr. Céline Verheggen** qui ont accepté d'être mes rapporteuses. Au **Pr. Nancy Standart**, au **Dr. Hervé Le Hir** et au **Pr. Frédéric Devaux** qui ont accepté d'examiner mon travail. Venus de Strasbourg, de Montpellier, de Cambridge, et de Paris, c'est un honneur pour moi que vous ayez évalué mon travail, et une chance de pouvoir bénéficier de vos retours et conseils.

Aux membres de l'équipe

Dominique Weil, je te remercie de m'avoir accueillie dans ton équipe de recherche. Le sujet m'avait réellement conquise depuis le début du master. Effectuer une thèse en recherche fondamentale était un rêve de longue date, que j'ai pu réaliser grâce à toi. Pour cela, je te suis reconnaissante, ainsi que pour tout ce que tu m'as apporté aux niveaux scientifique et humain.

Michèle Ernoult-Lange, tu m'as épaulée tout au long de ma thèse, au bureau comme à la paillasse. Tes conseils m'ont permis d'avancer rapidement et de façon confiante dans le projet. Je te remercie d'avoir activement participé à faire de ma thèse ce qu'elle est.

Marianne Bénard, tu m'as été d'une grande aide, tant sur le plan scientifique qu'humain. Je te remercie de m'avoir consacré de ton temps pour discuter de mes résultats, de mes nombreuses interrogations et angoisses par rapport à ces 3 années. Je n'oublierai pas tes encouragements.

Michel Kress, je te remercie pour tes conseils scientifiques, pour m'avoir fait partagé ton expertise à la paillasse, pour ta patience lors de mes multiples tentatives pour communiquer avec l'ordinateur de la salle de microscopie et pour tous les conseils de « geek » dont je me suis servi pour épater Joël certains soirs.

Maïté Courel et **Arnaud Hubstenberger**, je vous remercie pour vos conseils scientifiques dont j'ai pu bénéficier durant ces deux dernières années. Arnaud, je n'oublierai pas nos discussions sur des points fondamentaux de mon projet de thèse. Je regrette de n'avoir pas eu l'occasion de découvrir ta passion pour le karaoké...ok... « That was easy ! ». Maïté, je n'oublierai pas tes questions pointues qui m'ont permis de m'interroger sur différents aspects

de la thèse. J'en profite pour saluer **Catherine Segalas**, merci pour tout ce que tu fais pour nous au quotidien, pour ta joie de vivre et pour les bonnes ondes que tu apportes au labo.

Aux membres du comité de suivi de thèse

Je remercie **Valérie Serre**, **Hervé Le Hir** et **Frédéric Devaux** pour m'avoir accordé du temps lors des comités de thèse durant ces 3 années. Nos discussions m'ont permis d'avancer efficacement dans mon projet. Vos encouragements m'ont été d'une grande aide.

Aux autres

Valérie Serre, je te remercie infiniment pour ton soutien depuis ces 5 dernières années. Je ne sais pas si tu en es consciente, mais tes précieux conseils m'ont conduite à vivre des expériences uniques et extraordinaires. J'espère que nous continuerons à partager de si bons moments.

Thierry Foulon, je te remercie pour tes conseils et ta disponibilité chaque fois que j'ai eu besoin de discuter. Tes réponses m'ont toujours éclairée de façon à faire les bons choix. J'en profite pour remercier **Ali Ladram** pour ses nombreux encouragements.

Je remercie également les personnes qui m'ont aidée à accomplir mon activité d'enseignement durant la thèse : **Pierre Sarthou** pour son écoute et sa disponibilité et **Claire Lagathu** pour ses bons conseils et sa gentillesse.

Vérène Stierlé, merci de m'avoir encouragée pendant ces deux années. Ton humour, ta gentillesse, ton intelligence et ton amitié m'ont accompagnée jusqu'à ce jour, et je suis certaine que notre complicité ira bien au delà. Je remercie également **Béatrice Jolles** pour ses conseils bienveillants tout au long de ma thèse, et lors des répétitions. Une sincère pensée pour **Johanne de Marchi**, pour ses qualités de bienveillance et de sympathie qui m'ont été précieuses.

Liliana Feldman et **Graciela Schneier**, mes bonnes fées, je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche très jeune à l' Association Française contre les Myopathies (AFM), et plus tard, à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM). J'en profite pour saluer chaleureusement **Rita Raisman-Vozari** qui m'a fait vivre une première expérience professionnelle extraordinaire au sein de son laboratoire. Je remercie

également **Majid Amar** qui m'a prise sous son aile avec beaucoup de gentillesse et de professionnalisme.

A **Patrick Gonce**, mon professeur de mathématiques et ami. Ton silence me pèse souvent, surtout dans les moments forts et heureux de ma vie que j'aurais sincèrement souhaité partager avec toi. Où que tu sois, ici ou ailleurs, je te remercie du fond du cœur pour m'avoir été d'un soutien inconditionnel il y a quelques années, et je pense à toi.

A mes amis « bioquelquechose », **Aïna** et **Xavier, Léa, Charlène, Marion** et **Nas, Charles, Thibaut** et **Camille, Tanguy** et **Raphaëlle**, en souvenir des bons moments que nous avons passés ensemble à Paris VII, en cours, en TP, en exams, en galère, et à Paris VI en enseignement, à la maison et en congrès. Merci pour votre amitié, et bon courage à ceux qui commencent, qui terminent, mais aussi à ceux qui prolongent l'aventure d'une année.

Une pensée particulière pour **Sébastien** et **Christophe**, mes anciens collègues de l'Institut de la Vision et amis, qui m'ont beaucoup appris, et manqué ces dernières années.

A mes très très proches

Maman, Papa, Jonh, avec vous tout est possible et réciproquement. Merci[∞] pour votre amour, votre présence à tout moment, votre bienveillance, vos conseils, votre générosité. Je suis consciente d'être la seule au monde à avoir la chance de vous avoir comme parents et frère, et il n'y a pas un jour qui passe sans que cette chance ne me comble de joie.

Martine, Franck, Patrick, Véronique, Benjamin, Raphaël et **Nicolas**, merci pour votre soutien et votre amour, et à bientôt pour célébrer tous ensemble d'heureux moments.

A **Joël**, le meilleur des maris. Je te demande pardon pour ces derniers mois passés le nez dans les publis, hantée par une humeur catastrophique, à me plaindre des petits maux qui font notre quotidien depuis plus de 7 mois. Tu es un élément indispensable à ma vie, je le savais déjà, mais ta présence dans ces moments m'a confortée dans cette idée. Merci d'être là, et d'écrire avec moi cette aventure fascinante et merveilleuse qu'est la vie avec toi.

A la vie, tissée des anciennes et nouvelles générations...

... A Rolande et Maurice Ayache, Paule et Georges Hamou ...

... Et à toi, que nous aimons déjà si fort !

Table des matières

Table des illustrations.....	9
Table des abréviations	12
Introduction.....	14
1. La traduction des ARNm chez les eucaryotes	17
1.1. Brefs rappels des étapes de maturation des pré-ARNm	17
1.2. Initiation de la traduction des ARNm	19
1.2.1. Formation du complexe de pré-initiation 43S et recrutement du complexe eIF4E.....	19
1.2.2. Identification du codon d'initiation par le complexe 43S	21
1.2.3. Assemblage de la sous-unité 60S du ribosome et traduction des ARNm.....	22
1.3. Un exemple de mécanisme d'initiation de la traduction ne nécessitant pas de coiffe : Les éléments « IRES »	24
2. Présentation de l'hélicase à motif DEAD DDX6	25
2.1. Structure primaire des hélicases à motif DEAD	26
2.2. Structure de l'hélicase DDX6	27
3. Répression de la traduction des ARNm	30
3.1. Exemples de mécanismes de contrôle de l'initiation de la traduction	30
3.1.1. Phosphorylation du facteur d'initiation eIF2	30
3.1.2. Inhibition de l'assemblage du complexe eIF4F à la coiffe des ARNm	30
3.1.3. Régulations de la traduction <i>via</i> les uORFs	31
3.2. Rôle des RBPs (RNA-Binding Proteins) dans la régulation de la traduction.....	32
3.2.1. Mécanismes de régulation de la traduction par la PABPC1	32
3.2.2. Mécanisme de formation d'une « boucle fermée » inhibitrice de la traduction des ARNm	32
3.2.3. Un exemple de complexe de répression de la traduction impliquant DDX6 : le complexe CPEB	34
3.2.4. Implication de DDX6 dans la répression de la traduction des ARNm	37
3.2.4.1. Interactions entre DDX6 et les protéines impliquées dans la répression de la traduction	37
3.2.4.2. Implication fonctionnelle de DDX6 dans la répression de la traduction des ARNm	39
3.2.5. Autre exemple de mécanisme de répression de la traduction des ARNm impliquant DDX6.....	41
4. Stabilité des ARNm	41
4.1. Déadénylation des ARNm	42
4.1.1. Le complexe PAN	42
4.1.2. Le complexe CCR4-NOT	42
4.1.3. La protéine PARN	43
4.1.4. Régulations de la déadénylation	44
4.2. Dégradation 5'-3' des ARNm	44
4.3. Dégradation 3'-5' des ARNm <i>via</i> l'exosome	45
4.4. Régulations de la dégradation des ARNm	47
4.4.1. Les AREs (AU-Rich Elements)	47
4.4.2. Le contrôle qualité des ARNm dans le cytoplasme : Importance du NMD (<i>Nonsense Mediated Decay</i>)	47
4.5. Implication de DDX6 dans la stabilité des ARNm	48
4.5.1. Interaction entre DDX6 et les protéines impliquées dans la dégradation des ARNm.	48
4.5.2. Implication fonctionnelle de DDX6 dans la dégradation d'ARNm spécifiques	50
5. L'ARN interférence.....	51
5.1. La voie de régulation des miARNs	52

5.1.1. Maturation des miARNs.....	52
5.1.2. Assemblage du complexe miRISC et reconnaissance de l'ARNm cible	53
5.1.3. Régulation de la traduction des ARNm par les miARNs	55
5.2. Implication de DDX6 dans l'ARN interférence	56
6. Les P-bodies	57
6.1. La découverte des P-bodies	58
6.2. Structure des P-bodies	58
6.3. Composition des P-bodies	60
6.3.1. Protéines localisées dans les P-bodies	60
6.3.2. Importance de la présence d'ARNm réprimée.....	62
6.4. Importance de DDX6 dans l'assemblage des P-bodies	62
6.5. Fonctions présumées des P-bodies	63
6.6. Les granules de stress en quelques mots	65
6.7. Dynamique d'assemblage des granules.....	67
6.7.1. Rôle des domaines d'interaction.....	67
6.7.2. Rôle du cytosquelette et des protéines motrices associées dans la mobilité des granules	68
6.8. Trafic des protéines entre granules.....	69
Projet de thèse	71
Résultats.....	74
1. Purification des partenaires protéiques de DDX6 dans les cellules épithéliales de mammifères	75
1.1. Choix de l'approche expérimentale	75
1.2. Purification à grande échelle des partenaires protéiques de DDX6.....	79
1.2.1. Processus expérimental.....	79
1.2.2. Visualisation de la protéine DDX6 recombinante par rapport à la protéine DDX6 endogène	80
1.2.3. Contrôle de la qualité de purification	82
2. Identification des partenaires protéiques de DDX6 par spectrométrie de masse.....	83
2.1. Technique de spectrométrie de masse utilisée par la plateforme de protéomique de Cambridge.....	83
2.2. Analyse des données de spectrométrie de masse	83
2.3. Analyse qualitative des résultats de spectrométrie de masse.....	84
2.3.1. DDX6 est impliquée dans des complexes de dégradation des ARNm.....	87
2.3.2. DDX6 est impliquée dans des complexes de répression de la traduction des ARNm..	88
2.3.3. DDX6 est impliquée dans un complexe cytoplasmique composé des protéines ataxin 2 et 2-like	90
2.3.4. Les protéines du cœur du complexe de jonction d'exons (EJC)	91
2.3.5. Les protéines ribosomales.....	93
3. Caractérisation des complexes protéiques contenant la protéine DDX6	93
3.1. DDX6 est impliquée dans des complexes protéiques de différentes tailles.....	94
3.2. Analyse de certains partenaires protéiques de DDX6 sur gradients de sucrose ..	95
4. Maintien des P-bodies dans les cellules HeLa	96
4.1. Assemblage des P-bodies <i>de novo</i> dans les cellules HeLa.....	99
4.2. Etude de l'influence de DDX6, 4E-T et LSM14A sur l'assemblage des P-bodies dans différentes conditions de stress.....	101
5. Analyse des partenaires protéiques de DDX6 dans des cellules bloquées en mitose et dépourvues de P-bodies	103

5.1. Stratégie expérimentale	103
5.2. Résultats de la spectrométrie de masse	106
5.3. Analyse qualitative des résultats de spectrométrie de masse.....	107
5.3.1. Comparaison des échantillons de cellules mitotiques et asynchrones.....	107
5.3.2. Comparaison des deux expériences de purification des complexes contenant DDX6	111
Discussion et perspectives.....	113
Matériel et Méthodes	127
1. Culture Bactérienne	128
2. Culture cellulaire.....	128
2.1. Conditions de culture.....	128
2.2. Transfections par le chlorure de calcium	128
2.3. Réverse transfection de siARNs par la Lipofectamine™2000.....	129
2.4. Traitements des cellules.....	130
3. Anticorps.....	130
4. TAP-tag (Tandem Affinity Purification –Tag).....	131
5. Immunoprécipitations	132
6. Western Blot	132
7. Immunofluorescence	133
8. Gradients de sucre.....	133
9. Spectrométrie de masse.....	134
Références	135
Annexes	161
Annexe 1 : Article	Erreur ! Signet non défini.
Annexe 2 : Tableau des protéines identifiées avec les 20 meilleurs scores dans la première analyse de spectrométrie de masse (MS1)	181
Annexe 3 : Tableau des protéines identifiées avec les 20 meilleurs scores dans la deuxième analyse de spectrométrie de masse (MS2).....	182

Table des illustrations

Introduction

Figure I 1 : Les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes	15
Figure I 2 : Recrutement du complexe eIF4F au 43S PIC et balayage de l'ARNm	19
Figure I 3 : Identification du codon d'initiation et formation du ribosome 80S sur l'ARNm	21
Figure I 4 : Recyclage des sous-unités du ribosome à l'issue de la terminaison de la traduction.	23
Figure I 5 : Organisation et arrangement des domaines portés par l'hélicase à motif DEAD DDX6	28
Figure I 6 : Un modèle d'inhibition de la traduction	30
Figure I 7 : Modèle de répression de la traduction des ARNm	32
Figure I 8 : Tableau de modèles de répression décrits chez le xénope et chez la drosophile.....	32
Figure I 9 : Complexe de répression de la traduction CPEB chez le xénope	36
Figure I 10 : Les différentes voies de dégradation des ARNm.....	45
Figure I 11 : La voie de biogenèse et de maturation des microARNs	53
Figure I 12 : Schéma du complexe RISC	56
Figure I 13 : Ultra-structure des P-bodies (Souquere et al., 2009)	58
Figure I 14 : Protéines localisées dans les P-bodies.....	61
Figure I 15 : Influence des protéines CPEB1 et DDX6 sur l'assemblage des P-bodies (Serman et al., 2007)	62
Figure I 16 : Ultra-structure des granules de stress (Souquere et al., 2009)	64

Résultats

Figure R 1 : Schéma du plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA.....	76
Figure R 2 : Stratégie préliminaire de purification des complexes protéiques contenant DDX6.	76
Figure R 3 : Double purification des complexes protéiques contenant la protéine FLAG-RFP-DDX6-HA	77
Figure R 4 : Contrôle de l'efficacité de transfection de la protéine FLAG-DDX6-HA dans les cellules HEK293	78
Figure R5 : Purification des complexes protéiques contenant FLAG-DDX6-HA	78
Figure R 6 : Stratégie expérimentale finale de purification à grande échelle des partenaires protéiques de DDX6	79
Figure R7 : Analyse de la protéine transfectée FLAG-DDX6-HA	80
Figure R 8 : Estimation de l'enrichissement de DDX6 dans les P-bodies, dans les cellules HEK293	81

Figure R9 : Analyse de la qualité de purification et préparation des échantillons pour l'envoi en spectrométrie de masse	82
Figure R10 : Résultats de la spectrométrie de masse.....	84
Figure R11 : Tableau récapitulatif de l'analyse réalisée sur GO, de l'enrichissement des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN	85
Figure R 12 : Annotation manuelle des protéines identifiées en spectrométrie de masse.....	86
Figure R13 : Partenaires protéiques de DDX6 impliquées dans la dégradation des ARNm	88
Figure R 14 : Partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans la répression de la traduction des ARNm.....	89
Figure R15 : Partenaires de DDX6 partageant un complexe cytoplasmique impliqué dans le métabolisme de l'ARN	91
Figure R16 : Les protéines du cœur du complexe de jonction d'exons interagissent avec DDX6	92
Figure R17 : Protéines ribosomales identifiées comme partenaires protéiques de DDX6	93
Figure R18 : Localisation de la protéine DDX6 sur gradients de sucrose	95
Figure R 19 : Localisation des protéines DDX6, LSM14A, EDC4 et EDC3 sur gradients de sucrose	96
Figure R20 : Rôle des partenaires protéiques de DDX6 dans le maintien des P-bodies	97
Figure R21 : Expérience de complémentation avec le mutant de DDX6 « mut1 »	99
Figure R 22 : Rôle des protéines localisées dans les P-bodies dans leur assemblage après traitement des cellules à l'arsénite	100
Figure R23 : Comparaison de l'effet des 2 drogues et du choc thermique sur la traduction, dans les cellules HeLa	102
Figure R 24 : Contrôle du blocage des cellules en mitose, par cytométrie de flux.....	104
Figure R25 : Analyse de la qualité de purification et préparation des échantillons pour l'envoi en spectrométrie de masse	105
Figure R 26 : Résultats de la deuxième spectrométrie de masse (MS2), à partir de cellules HEK293 bloquées en mitose	106
Figure R27 : Annotation manuelle et analyse GO des protéines identifiées en spectrométrie de masse.....	108
Figure R 28 : Tableau de score des partenaires majoritaires de DDX6 identifiées dans la deuxième spectrométrie de masse.....	109
Figure R 29 : Protéines identifiées uniquement dans l'échantillon des cellules bloquées en mitose (MS2)	110
Figure R 30 : Protéines identifiées uniquement dans l'échantillon de cellules asynchrones.....	111

Discussion et perspectives

Figure D 1 : DDX6 est impliquée dans les complexes de décoiffage et de dégradation 5'-3' des ARNm, dans les cellules humaines	115
Figure D 2 : DDX6 est impliquée dans un complexe de répression de la traduction "CPEB-like", dans les cellules humaines	118
Figure D 3 : Modèle de fixation multiple de DDX6 permettant la liaison simultanée d'un complexe de répression "CPEB-like" et du complexe de dégradation 5'-3 des ARNm	119
Figure D 4 : Répression de la traduction des ARNm par ATXN2, dans les polysomes	123

Table des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
ABC : ATP Binding Casette
BRF : Butyrate Response Factor 1 et 2
CAT1 : Cationic Amino acid Transporter 1
CBC : Cap-Binding Complex
CBP : Cap-Binding Protein
CENP-F : CENtromere Protein type F
CITE : Cap Independent Translation Enhancers element
CPE : Cytoplasmic Polyadenylation Elements
CPEB1 : Cytoplasmic Polyadenylation Elements Binding protein 1
CrPV : Cricket Paralysis Virus
DICE : Differentiation Control Element
4E-BP : eIF4E Binding Protein
eIF : Ekaryotic Initiation Factor
eIF2-TC : eIF2-Ternary Complex
EJC : Exon Junction Complex
EMCV : EncephaloMyoCarditis Virus
eRF : eucaryotic Release Factors
FISH : Florescence In Situ Hybridisation
FMRP : Fragile X Mental Retardation Protein 1
FXR2 : Fragile X mental Retardation syndrome-related proteins
GCN2 : General Control Nondepressible 2
GDP : Guanosine Di-Phosphate
GM-CSF : Granulocytes-Monocytes Colony-Stimulating-Factor
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
hnRNP : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HRI : Haem- Regulated-Inhibitor
IRE : Iron-Responsive Element
IRES : Internal Ribosome Entry Sites
ITAF : IRES-Transacting Factor

miARN : MicroARN
 MLN51 : Metastatic Lymph Node 51
 NGD : No-Go-Decay
 NMD : Nonsense Mediated Decay
 NSD : Non Stop Decay
 NTP : Nucléosides TriPhosphates
 NUFIP : Nuclear FMRP Interacting Protein
 PABPC : Poly(A)-Binding Protein Cytoplasmic 1
 PABPN1 : Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1
 PAN3 : Poly(A) Nucléase 2 et 3
 PARN : Poly(A)-specific Ribonuclease
 PERK : PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase
 piARN : PIWI Interacting ARN
 43S-PIC : Pré-Initiation Complex 43S
 PAIP : Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2
 P-bodies : Processing bodies
 PIWI : P-element Induced Wimpy
 PKR : Protéine Kinase activée par l'ARN double brin
 post-TC : Post-Terminaison Complex
 PRD : Prion-Related Domain
 PUF : Pumilio Fem binding factor
 PTC : Premature Termiaison Codon
 RAP55B : RNA-Associated Protein of 55 KDa
 RBP : RNA-Binding Protein
 RNase : Ribonucléase
 RRM : RNA Recognition Motif
 siARN : Small Interfering ARN
 SMIGs : Small MLN51-Induced Granules
 SKI : SuperKiller
 TRBP : TAR RNA Binding Protein
 TTP : Tristetraproline
 uORF : Upstream Open Reading Frame
 UTR : UnTranslated Region

Introduction

L'expression des gènes est un processus fondamental qui conduit le génome, codé par l'ADN (Acide Désoxyribonucléique), à faire fonctionner un organisme dans son ensemble. Il est à la base de bien des processus biologiques tels que la croissance, la division, la différenciation, le développement des cellules, et leur adaptation aux stress environnementaux. C'est en 1961 que François Jacob et Jacques Monod observent que chez les eucaryotes, l'ADN est localisé dans le noyau de la cellule alors que la synthèse protéique a lieu dans le cytoplasme, suggérant l'existence d'une molécule intermédiaire. En se fondant sur des recherches relatives à l'opéron lactose d'*Escherichia coli*, ils font l'hypothèse que les gènes sont d'abord « transcrits » en une molécule intermédiaire dans le noyau, baptisée facteur X, et montrent par la suite qu'il s'agit d'un acide ribonucléique messenger (ARNm), à son tour traduit en protéine dans le cytoplasme. En 1965, le prix Nobel de médecine est attribué à François Jacob, Jacques Monod et André Lwoff pour leurs travaux sur la régulation de l'expression des gènes chez *Escherichia coli*, qui montrent que la transcription d'un gène nécessite la présence de plusieurs protéines dites régulatrices, intervenant directement au niveau de l'ADN en se fixant sur les « promoteurs » des gènes (Jacob and Monod, 1960). Dès lors, cette démonstration fera des régulations transcriptionnelles un sujet intensivement étudié pour comprendre davantage le contrôle de l'expression des gènes.

A l'inverse, peu d'études portaient sur le contrôle de l'expression des gènes *via* des régulations post-transcriptionnelles. En 1975, une première analyse sur des cellules de foie de rat traitées au fer conduit à faire l'hypothèse que la biosynthèse intracellulaire de la ferritine est régulée positivement par le fer, au niveau traductionnel (Zähringer et al., 1976). En 1987, la même observation est à nouveau faite dans des fibroblastes de souris et un élément de régulation « IRE » (Iron-Responsive Element) est identifié sur l'ARNm codant la ferritine (Hentze et al., 1987). En 1991, le rôle des séquences riches en AU en 3'UTR (UnTranslated Region) des ARNm, dans la stabilité des transcrits GM-CSF (Granulocytes-Monocytes Colony-Stimulating-Factor) est documenté dans des cellules hématopoïétiques, mettant en avant le rôle important des régulations post-transcriptionnelles dans le contrôle de l'expression des gènes (Akashi et al., 1991). Le séquençage du génome humain à partir de 1990 puis l'irruption des analyses haut débit, comme les puces à ADN et le séquençage de l'ARN ont largement contribué à la compréhension de ces mécanismes.

Il est désormais bien établi que l'expression des gènes est contrôlée à différents niveaux, allant de la transcription de l'ADN en ARN dans le noyau, et jusqu'à la dégradation

des protéines, en passant par la traduction des ARNm en protéines dans le cytoplasme. Ces régulations sont de 3 types : Les régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles (**Figure I1** adaptée de (Mata et al., 2005).

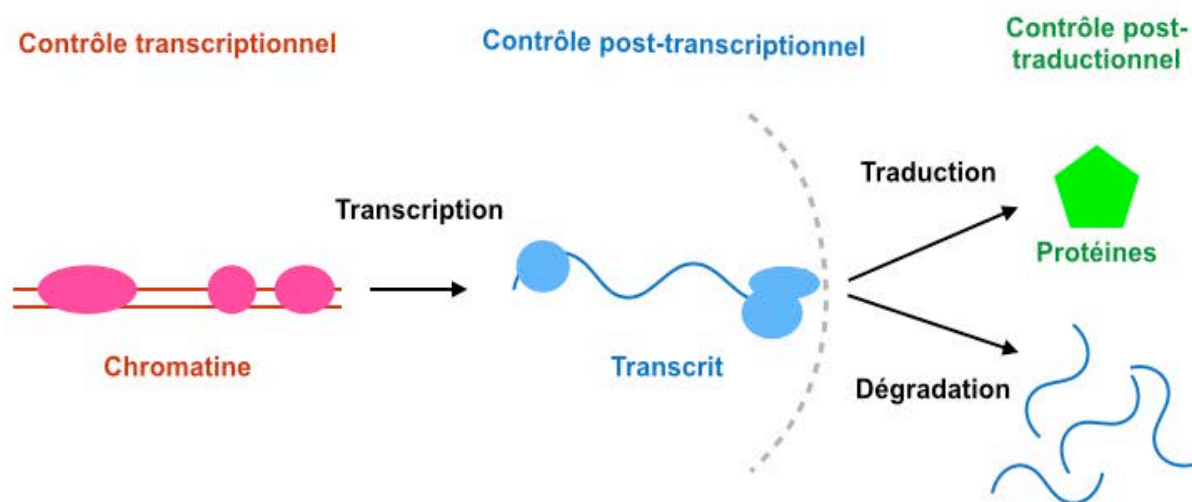


Figure I 1 : Les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes

L'expression des gènes est régulée aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels

Importance des régulations post-transcriptionnelles

Certaines études récentes comparent l'influence de chacune de ces étapes sur la régulation de l'expression des gènes. En 2011, Schwanhäusser et al., publient la première analyse de mesure de l'abondance des ARNm, des protéines et de leur temps de vie pour plus de 5000 gènes de mammifères ((Schwanhäusser et al., 2011). Ils montrent une corrélation entre les niveaux d'ARNm et de protéines et observent que l'abondance des protéines est majoritairement régulée au niveau traductionnel, la stabilité des protéines ayant un rôle mineur dans des fibroblastes de souris. Ils démontrent également que 40% de la variation du niveau de protéines s'explique par la variation du taux de transcription des ARNm. Ces mêmes conclusions sont faites dans une analyse similaire réalisée dans des cellules dendritiques (Rabani et al., 2011). En 2014, les conclusions de Schwanhäusser et al., sont affinées dans une analyse reprenant le même jeu de données, mais en incluant des données statistiques prenant en compte l'impact des erreurs expérimentales : la transcription explique alors environ 38 % de la variation des niveaux de protéines, la dégradation de l'ARN 18%, la

traduction 30% et la dégradation des protéines 14% (Li et al., 2014). Si ces études divergent sur l'importance réelle des différentes étapes de régulation, elles s'accordent sur l'importance des régulations post-transcriptionnelles dans le processus de contrôle de l'expression des gènes.

1. La traduction des ARNm chez les eucaryotes

Avant de passer à la suite de cette introduction qui portera essentiellement sur les régulations post-transcriptionnelles ayant lieu dans le cytoplasme, nous reviendrons brièvement sur les étapes de maturation des pré-ARNm.

1.1. Brefs rappels des étapes de maturation des pré-ARNm

Associés à des protéines, les ARN en cours de synthèse subissent des modifications structurales importantes pour leur stabilité (Proudfoot and O'Sullivan, 2002). Les ARN sont en effet coiffés, épissés et polyadénylés. Les protéines associées dictent le moment auquel les ARNm seront exportés hors du noyau, leur localisation subcellulaire dans le cytoplasme, à quel moment ils seront traduits, et leur mode de dégradation (Singh et al., 2015). Ces complexes ribonucléoprotéiques (mRNPs) sont exportés hors du noyau, leur composition protéique étant modifiée au cours des différentes étapes du métabolisme des ARNm.

Synthèse de la coiffe

Une coiffe m⁷G est tout d'abord ajoutée après synthèse de 20 à 30 nucléotides, à l'extrémité 5' des pré-ARNm néosynthétisés (Gu and Lima, 2005). Elle est constituée d'une guanosine méthylée en N7, et est liée au premier nucléotide constituant le pré-ARNm. Dans le noyau, les deux sous-unités CBP20 et CBP80 du complexe CBC (*Cap-Binding Complex*) se fixent à la coiffe et permettent la protection du pré-ARNm contre les enzymes de dégradation ainsi que l'export de l'ARNm dans le cytoplasme. Après le premier cycle de traduction dans le cytoplasme, le complexe CBC est remplacé par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E.

Polyadénylation des pré-ARNm

L'extrémité 3' des ARNm est clivée. A cette extrémité, la poly(A) polymérase catalyse la synthèse d'une queue poly(A) constituée de 200 à 300 résidus d'adénosine (Colgan and Manley, 1997). Parallèlement, la PABPN1 (*Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1*) peut s'associer à la queue poly(A) et faciliter sa synthèse en augmentant la processivité de la poly(A) polymérase (Kühn and Wahle, 2004). Après le premier cycle de traduction, la PABPN1 est remplacée par une des 4 PABPC (*Poly(A)-Binding Protein Cytoplasmic*) (PABPC1, PABPC2, PABPC3, PABPC4) dans le cytoplasme. Ces protéines sont impliquées dans l'efficacité de traduction, et dans la régulation de la dégradation des ARNm (Kühn and Wahle, 2004). Nous y reviendrons dans la partie 3.2.

Pour constituer un ARNm mature, des régions présentes sur les pré-ARNm, les introns, doivent être éliminées. C'est le processus d'épissage.

Epissage des pré-ARNm

Les introns des pré-ARNm sont épissés par le spliceosome pour générer un ARNm fonctionnel, prêt à être traduit (Jurica and Moore, 2003). Le spliceosome reconnaît les sites d'épissage, catalyse les réactions d'excision des introns et permet la ligation des exons. Le complexe de jonction d'exons (EJC, *Exon Junction Complex*) est alors déposé par le spliceosome, 24 nucléotides en amont de la jonction exon-exon. L'EJC est impliqué dans l'export des ARNm hors du noyau, dans leur localisation subcellulaire, dans leur contrôle qualité ainsi que dans la régulation de leur niveau de traduction (Giorgi and Moore, 2007). L'EJC est transporté avec l'ARNm mature dans le cytoplasme et sera dissocié à l'issue du premier cycle de traduction (Le Hir et al., 2000).

Une fois que l'ARNm est mature, c'est à dire coiffé, polyadénylé et épissé, il peut être exporté dans le noyau pour y être traduit en protéines. La traduction comprend 3 étapes majeures : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'activité de traduction est majoritairement régulée au niveau de l'étape d'initiation (Sonnenberg and Hinnebusch, 2009).

1.2. Initiation de la traduction des ARNm

L'initiation de la traduction comprend 3 étapes majeures : la formation d'un complexe de pré-initiation 43S (43S PIC), l'identification du codon d'initiation AUG par balayage de l'ARNm par le complexe 43S, et la formation d'un ribosome 80S fonctionnel.

1.2.1. Formation du complexe de pré-initiation 43S et recrutement du complexe eIF4E

La formation du complexe de pré-initiation marque le début de l'initiation de la traduction. Il est constitué de la sous-unité 40S du ribosome, d'un complexe ternaire (eIF2-TC, *eIF2-Ternary Complex*) composé du facteur d'initiation eIF2, d'une molécule de GTP, de la méthionine initiatrice Met-ARN^{ti}Met, et d'un ensemble de facteurs d'initiation comprenant eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 (Jackson et al., 2010a). Dès lors qu'une molécule de GTP est fixée en son site catalytique, eIF2 s'associe à la méthionine initiatrice avec une forte affinité (Kapp and Lorsch, 2004). L'interaction entre les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 et la petite sous-unité du ribosome 40S permet le recrutement du complexe eIF2-TC (**Figure I2**). Cela entraîne également un changement de conformation au niveau du canal d'entrée de l'ARNm en position « ouverte », permettant le balayage de l'ARNm (partie 1.2.2.). En effet, c'est le facteur d'initiation eIF5, lié à eIF3 qui contacte eIF2, et qui permet l'association d'eIF2-TC au site P de la sous-unité 40S du ribosome. eIF1A lié au site A interagit également avec eIF2, et stabilise l'association d'eIF2-TC à la sous-unité 40S du ribosome. L'association de la sous-unité 40S, du complexe eIF2-TC et des 4 facteurs d'initiation forme le complexe 43S PIC (Jackson et al., 2010a; Majumdar et al., 2003). eIF3 sert de plateforme d'interaction entre le 43S PIC et un autre complexe, eIF4F, et permet son recrutement sur l'ARNm.

Parallèlement, le complexe eIF4F est constitué de trois facteurs d'initiation : eIF4E, eIF4A et eIF4G. La coiffe est reconnue par le facteur eIF4E. eIF4E est associé à eIF4G qui porte un site de fixation à l'ARN. Cette interaction permet la stabilisation du complexe eIF4F à l'extrémité 5' de l'ARNm sur lequel il est fixé. eIF4G interagit également avec l'hélicase à ARN eIF4A, et permet son ancrage dans la région 5'UTR de l'ARNm. En hydrolysant l'ATP, eIF4A déroule les structures secondaires, et permet ainsi l'association du 43S PIC à l'ARNm (**Figure I2**). Des études ont montré que l'hélicase eIF4A était peu processive, et que *in vitro*

comme *in vivo*, son activité était stimulée par eIF4G, eIF4B ou par son homologue structural eIF4H (Rozovsky et al., 2008).

Simultanément, par ses interactions avec eIF4E et avec la protéine PABP liée à la queue poly(A), eIF4G peut rapprocher les extrémités 5' et 3' de l'ARNm (Wells et al., 1998). Une étude s'est intéressée à comprendre l'importance du complexe eIF4E-eIF4G-PABP et de la formation de cette boucle fermée dans l'efficacité de la traduction. Chez la levure, la déplétion d'eIF4G *in vivo* diminue mais n'abolit pas l'activité de la traduction, et les expériences *in vitro* confirment qu'eIF4G serait un activateur de la traduction, et non pas un élément absolument nécessaire à l'association entre l'ARNm et le 43S PIC (Park et al., 2011). L'association des complexes eIF4F et 43S PIC va permettre de balayer l'ARNm de 5' vers 3', jusqu'à identifier le codon initiateur AUG (Aitken and Lorsch, 2012).

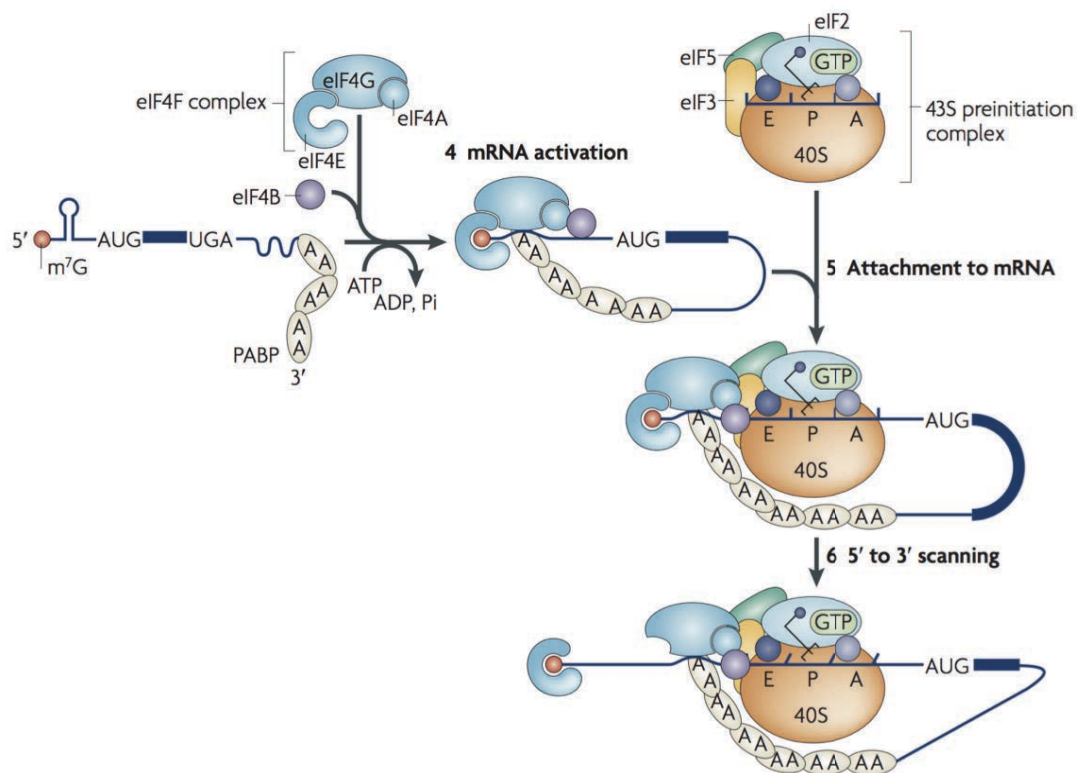


Figure I 2 : Recrutement du complexe eIF4F au 43S PIC et balayage de l'ARNm

Le complexe eIF4F se lie au niveau de la coiffe des ARNm, et permet le rapprochement entre la coiffe et la queue poly(A) des ARNm, formant une boucle dite « boucle fermée », conformation de l'ARNm facilitant le recrutement du 43S PIC. Aidé de l'hélicase à ARN eIF1A, le complexe 43S va balayer l'ARNm à la recherche du codon d'initiation AUG. (Adapté de de Jackson et al., 2010)

Brièvement, des études récentes révèlent l'existence d'une initiation de la traduction indépendante d'eIF4E. En effet, la protéine 4E-T peut interagir avec la coiffe indépendamment de la présence de eIF4E, et inhiber la traduction des ARNm indépendamment de son interaction avec eIF4E (Kamenska et al., 2014).

1.2.2. Identification du codon d'initiation par le complexe 43S

Mécanisme de balayage du complexe 43S

Le complexe 43S doit identifier le codon d'initiation pouvant se trouver à plus de 1000 nucléotides de la coiffe (Mignone et al., 2002). Son activité de balayage consiste à dérouler les structures secondaires présentes dans la région 5'UTR de l'ARNm, et à assurer le mouvement du complexe 43S. Sans facteur additionnel, le complexe 43S est capable de balayer les régions 5'UTR non structurées, les facteurs eIF1 et eIF1A le constituant étant indispensables à cette fonction intrinsèque (Pestova and Kolupaeva, 2002). Dès lors que la région 5'UTR contient des structures secondaires, l'intervention de l'hélicase eIF4A, accompagnée des facteurs eIF4B et eIF4G est indispensable pour les dérouler (Pestova and Kolupaeva, 2002). L'initiation s'effectue lors de l'identification du premier codon AUG présentant un contexte optimal, c'est à dire inclus dans une séquence de type GCC(A/G)CCAUGG, avec une base purique 3 bases en amont du codon d'initiation, et une guanine 4 bases en aval (Marilyn Kozak, 1991). L'augmentation de la taille de la région 5'UTR à balayer, ainsi que la présence de structures secondaires non déroulées dans cette région réduisent l'efficacité d'initiation de la traduction (Vassilenko et al., 2011).

Mécanisme d'identification du codon d'initiation

Chez la levure, le mutant de l'homologue d'eIF1, Sui⁻, entraîne une perte de la fidélité d'identification du bon codon d'initiation (Martin-Marcos et al., 2011). eIF1 est donc un facteur déterminant dans la reconnaissance du codon d'initiation par le complexe 43S. En l'absence du facteur eIF1, les sous-unités 40S du ribosome peuvent identifier le « mauvais » codon d'initiation. eIF1 a la possibilité de dissocier ces ribosomes « mal associés » (Hershey et al., 2012; Pestova and Kolupaeva, 2002). La reconnaissance du codon d'initiation AUG par l'ARNt et leur appariement au niveau du site P sont accompagnés de divers changements : le renforcement de l'interaction entre eIF1A et la sous-unité 40S, le déplacement d'eIF1 à

proximité du site P, et l'hydrolyse du GTP entraînant l'élimination partielle d'eIF2 par perte d'affinité pour le complexe d'initiation (**Figure I3**). Ces changements d'organisation entraînent la conformation dite « fermée » de la sous-unité 40S du ribosome sur l'ARNm, stabilisant ainsi l'interaction 40S-ARNm (Jackson et al., 2010a; Maag et al., 2005).

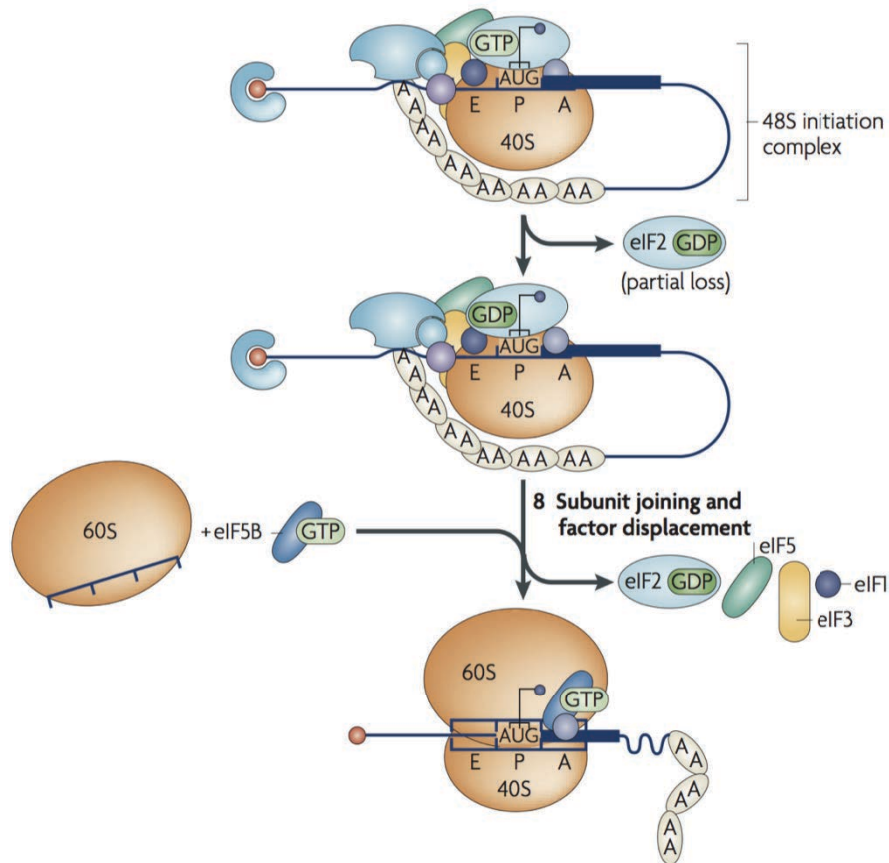


Figure I 3 : Identification du codon d'initiation et formation du ribosome 80S sur l'ARNm

Le facteur d'initiation eIF1 permet la reconnaissance du codon d'initiation AUG. Le facteur d'initiation eIF5B accompagné d'eIF1A et de la sous-unité 60S se fixent alors à la sous-unité 40S du ribosome (Jackson et al., 2010)

1.2.3. Assemblage de la sous-unité 60S du ribosome et traduction des ARNm

Mécanisme d'assemblage de la sous-unité 60S

L'assemblage de la grande sous-unité 60S et de la petite sous-unité 40S du ribosome sur l'ARNm est orchestré par la GTPase eIF5B (Pestova et al., 2000). Pour permettre l'assemblage de la grande sous-unité, les facteurs eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 et eIF5 fixés à la surface de contact entre le 40S et le 60S doivent être dissociés (**Figure I3**). C'est l'interaction

entre eIF5B et eIF1A par leurs extrémités C-terminales qui déclenche l'hydrolyse d'eIF5B-GTP, et permet la dissociation des facteurs d'initiation présents à la surface de contact (Andrey V. Pisarev et al., 2006). eIF5B-GDP perd alors son affinité pour le ribosome 80S ainsi formé. Il se dissocie donc du ribosome, entraînant avec lui eIF1A.

Une fois le ribosome 80S formé et stabilisé sur le codon d'initiation de la traduction, l'élongation de la traduction peut débuter. Avec l'aide du facteur eIF1A, l'ARNt présente au site A du ribosome l'aminoacyl correspondant au codon lu sur l'ARNm. Le site peptidyl-transférase de la sous-unité 60S du ribosome catalyse la formation de la liaison peptidique entre la chaîne polypeptidique déjà présente dans le site P, et l'aminoacyl nouvellement présenté par l'ARNt au niveau du site A. Lorsque la liaison peptidique est formée, le ribosome est transloqué sur le codon suivant à l'aide du facteur eIF2. Dès lors qu'un codon STOP ambre (UAG), ocre (UAA) ou opale (UGA) est présenté par l'ARNm au site A, la terminaison de la traduction est orchestrée par les facteurs eRF1 et eRF3 (*eucaryotic Release Factors*).

Ces deux facteurs, accompagnés d'une molécule de GTP portée par eRF3, se lient au site A du ribosome. eRF1 assure la reconnaissance du codon STOP et déclenche un changement de conformation qui stimule l'hydrolyse de la molécule de GTP portée par eRF3. Cette hydrolyse conduit au détachement du polypeptide néosynthétisé. A l'issue de la terminaison de la traduction, l'ARNm, l'ARNt, eRF3 et eRF1 restent associés au 80S. Ce complexe est appelé complexe de post-terminaison (post-TC). Un processus de recyclage des sous-unités ribosomales est alors mis en place, permettant la dissociation du post-TC.

Recyclage des sous-unités ribosomales du post-TC

Ce processus permet le maintien d'un pool de sous-unités ribosomales disponibles pour l'initiation de nouveaux cycles de traduction. Il est assuré par le facteur de recyclage ABCE1, de la famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Casette*) (Pisarev et al., 2010). En présence d'ATP, le facteur ABCE1 s'associe à eRF1 au sein du post-TC (**Figure I4**). Cette association déclenche le départ du facteur eRF3 par encombrement stérique. La liaison du facteur ABCE1 au post-TC entraîne l'hydrolyse de son cofacteur ATP, et la dissociation d'eIFA, du 60S et du 40S (Pisarev et al., 2010). Les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 s'associent

alors à la sous-unité 40S : eIF1 induit la dissociation de l'ARNt et eIF3j celle de l'ARNm (Pisarev et al., 2007).

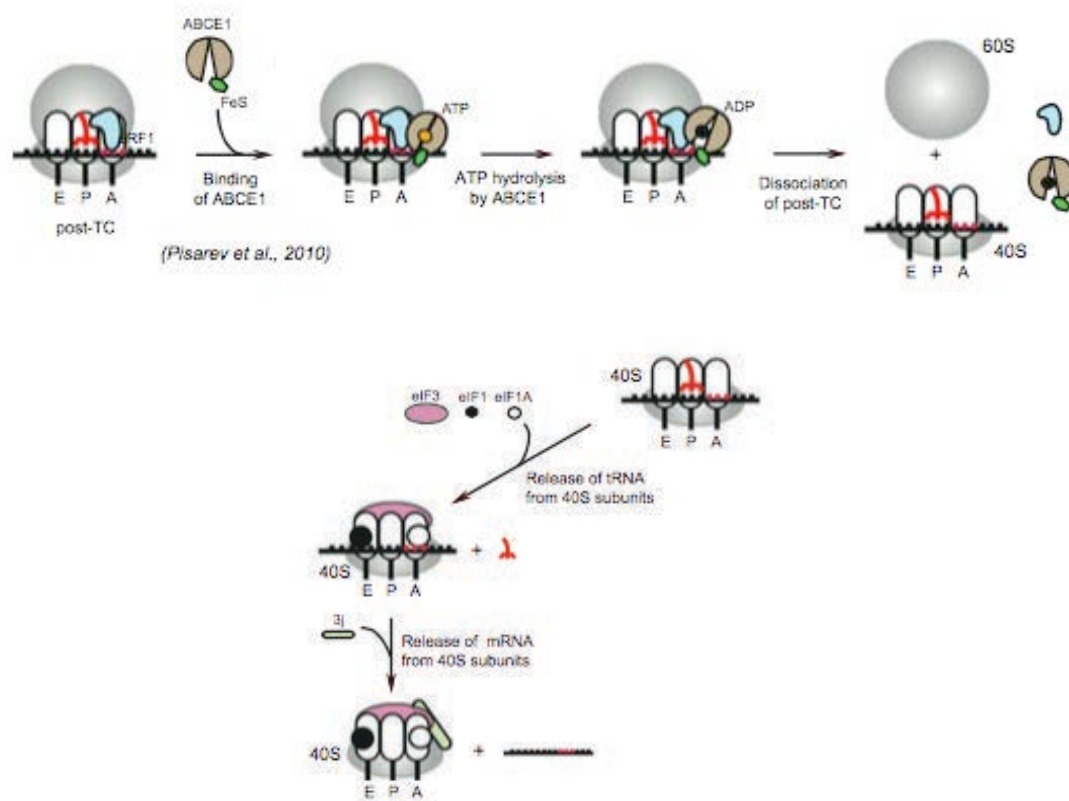


Figure I 4 : Recyclage des sous-unités du ribosome à l'issue de la terminaison de la traduction

En présence d'ATP, le facteur ABCE1 s'associe à eRF1 au sein du post-TC. La liaison du facteur ABCE1 au post-TC entraîne l'hydrolyse de son cofacteur ATP, et la dissociation d'eIF1A, du 60S et du 40S. Les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 s'associent alors à la sous-unité 40S : eIF1 induit le départ de l'ARNt et eIF3j le départ de l'ARNm (Pisarev et al., 2010 ; Jackson et al., 2012).

1.3. Un exemple de mécanisme d'initiation de la traduction ne nécessitant pas de coiffe : Les éléments « IRES »

Le modèle d'initiation de la traduction que nous venons de voir, débutant par la reconnaissance de la coiffe par le complexe eIF4F est le plus classiquement observé chez les ARNm eucaryotes. Cependant, plusieurs modèles d'initiation de la traduction ne nécessitant pas la présence d'une coiffe à l'extrémité 5' des ARNm ont été décrits. L'un d'eux repose sur l'existence de sites d'entrée du ribosome au sein de la séquence d'ARNm, les IRES

(« *Internal Ribosome Entry Sites* »), découverts en 1988 (Pelletier and Sonenberg, 1988), et qui concerneraient plus de 100 ARNm cellulaires (Mokrejs et al., 2010). Les IRES sont des séquences très structurées présentes dans les régions 5'UTR des ARNm. La sous-unité 40S est recrutée par l'ARNm au niveau de ces segments. Ces séquences sont également retrouvées au sein d'ARNm viraux (Lackner and Bähler, 2008). Les séquences portant des IRES ne sont pas conservées et leur mécanisme de fonctionnement peut varier considérablement en fonction de la séquence dans laquelle l'IRES est présent. Les IRES du CrPV (« *Cricket Paralysis Virus* ») ne nécessitent pas de facteurs d'initiation de la traduction pour recruter un ribosome (Spahn et al., 2004), tandis que les IRES présents au sein des ARNm d'EMCV (« *Encephalomyocarditis Virus* ») utilisent les facteurs d'initiation de la cellule hôte précédemment décrits. Certains IRES nécessitent l'intervention de facteurs pour stabiliser leur conformation ; C'est le cas des ITAFs (« *IRES-Transacting Factors* »). Ce sont des protéines qui se lient à l'ARNm dans le noyau et/ou dans le cytoplasme, et qui permettent de recruter la sous-unité 40S au niveau des IRES (Pacheco and Martinez-Salas, 2010). Un autre modèle d'initiation de la traduction ne nécessitant pas de coiffe en 5' des ARNm est celui des éléments CITE (« *Cap Independent Translation Enhancers elements* ») observés en 3'UTR d'un grand nombre d'ARN viraux chez les plantes. Les CITE contiennent quasiment tous une structure tige-boucle, la boucle s'appariant à la région 5'UTR, et permettant l'initiation de la traduction (Miller et al., 2007; Miller and White, 2006).

Avant de présenter les différents modes de régulation de la traduction existant chez les eucaryotes, nous allons nous intéresser à la protéine DDX6 qui est l'élément central de mon projet de thèse. Plusieurs études réalisées au sein de divers organismes ont montré qu'elle était impliquée dans la répression de la traduction des ARNm, dans la dégradation de ces derniers, ainsi que dans l'ARN interférence. Après avoir présenté les caractéristiques structurales de DDX6, nous reviendrons à la description des différentes voies de régulation de la traduction. Chaque partie traitera d'une régulation de la traduction et comportera une sous-partie destinée à présenter l'implication de DDX6 dans cette voie de régulation.

2. Présentation de l'hélicase à motif DEAD DDX6

DDX6 (aussi appelée RCK/P54 chez l'homme) est une protéine de la famille des hélicases à motif DEAD, conservée des eucaryotes unicellulaires aux vertébrés. C'est une hélicase à ARN de 54 KDa qui se lie à l'ARNm avec une grande affinité ($K_d = 1\text{nM}$) et sans

spécificité de séquence (Dutta et al., 2011; Ernoult-Lange et al., 2012). Ses orthologues présentent de fortes identités de séquence et ont été caractérisés dans divers organismes : chez *Saccharomyces cerevisiae* (DHH11, 63,9% d'homologie de séquence), chez *Schizosaccharomyces pombe* (STE13, 67,4%), chez *Trypanosoma brucei* (tDHH1 (67,2%)), chez *Plasmodium berghei* (DOZI, 64%), chez *Spisula solidissima* (P47, 72,4%), chez *Caenorhabditis elegans* (CGH-1, 69,2%), chez *Drosophila melanogaster* (ME31B 67,5%), chez *Xenopus laevis* (XP54, 94,4%) et chez *Mus musculus* (mRCP/P54, 97,7%).

La protéine DDX6 humaine a été clonée pour la première fois à partir d'une lignée de cellules de lymphome RC-K8. L'ARNm de DDX6 est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus humains et de souris (Ostareck et al., 2014). L'abondance de la protéine DDX6 dans les cellules humaines HeLa est de 2.10^6 molécules par cellule (Ernoult-Lange et al., 2012). Etant donné qu'il y a 3.10^5 molécules d'ARNm, DDX6 est donc 7 fois plus abondante que l'ARNm dans ces cellules. Dans les ovocytes de xénope, DDX6 est aussi 15 fois plus abondante que les ARNm réprimés (2.10^{11} molécules par ovocyte) (Smillie and Sommerville, 2002), et chez le trypanosome 8 fois plus abondante que les ARNm (Kramer et al., 2010). L'abondance de DDX6 semble donc être une caractéristique de cette protéine conservée au cours de l'évolution.

2.1. Structure primaire des hélicases à motif DEAD

DDX6 fait partie de la superfamille SF2 des hélicases à motif DEAD. Cette superfamille est caractérisée par des motifs conservés que nous allons détailler ci-après (**Figure I5A**) (Cordin et al., 2006). Parmi les structures réalisées en cristallographie des membres de cette famille, et qui ont permis de mettre en évidence ces motifs conservés, il y a la protéine MjDEAD de *Methanococcus jannashii* dont la fonction n'a pas été caractérisée (Story et al., 2001), le facteur d'épissage UAP56 chez l'Homme cristallisé à deux reprises (Shi et al., 2004; Zhao et al., 2004), le facteur d'initiation eIF4A chez la levure (Caruthers et al., 2000) et le domaine N-terminal de la protéine BstDEAD de *Bacillus stearothermophilus* (Carmel and Matthews, 2004).

Ces hélicases présentent toutes un cœur de 350 à 400 acides aminés, constitué de deux domaines globulaires : D1 et D2 (**Figure I5A et I5B**). D1 et D2 présentent chacun un domaine « α - β RecA like », caractéristique des hélicases (Caruthers and McKay, 2002). D1

abrite les motifs I, Ia, Ib, II, et III, alors que les motifs IV, V et VI sont présents en C-terminale du domaine D2. Les motifs I (AKNGTGK) et II (DEAD), aussi appelés Walker A et B, sont impliqués dans la liaison aux nucléosides triphosphates (NTP) et au magnésium, et coordonnent l'hydrolyse des NTPs. Ils sont séparés par les motifs Ia (VPTRELALQ) et Ib (TPGR) qui sont nécessaires pour la liaison aux acides nucléiques. Entre les motifs Ia et Ib se trouve un doublet GG retrouvé dans la majorité des protéines à motif DEAD, et qui participerait aux interactions protéine-protéine chez eIF4A (Cordin et al., 2006; Linder et al., 1989). L'hydrolyse des NTP est assurée par le motif III (SAT), et l'activité de liaison à l'ARN par les motifs IV (IIF) et V (TRGID). Le motif VI (LHRIGRSGR) est impliqué dans les changements de conformation liés à l'hydrolyse des NTPs et dans l'activité hélicase (déroulement des structures secondaires). Le motif II de DDX6 contient la séquence D-E-A-D (Aspartate - Glutamate - Alanine – Aspartate) caractéristique des DEAD-box hélicases. Ces DEAD-box hélicases portent deux éléments de séquence supplémentaires : une phénylalanine ainsi qu'un motif Q en amont du motif I permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Tanner et al., 2003).

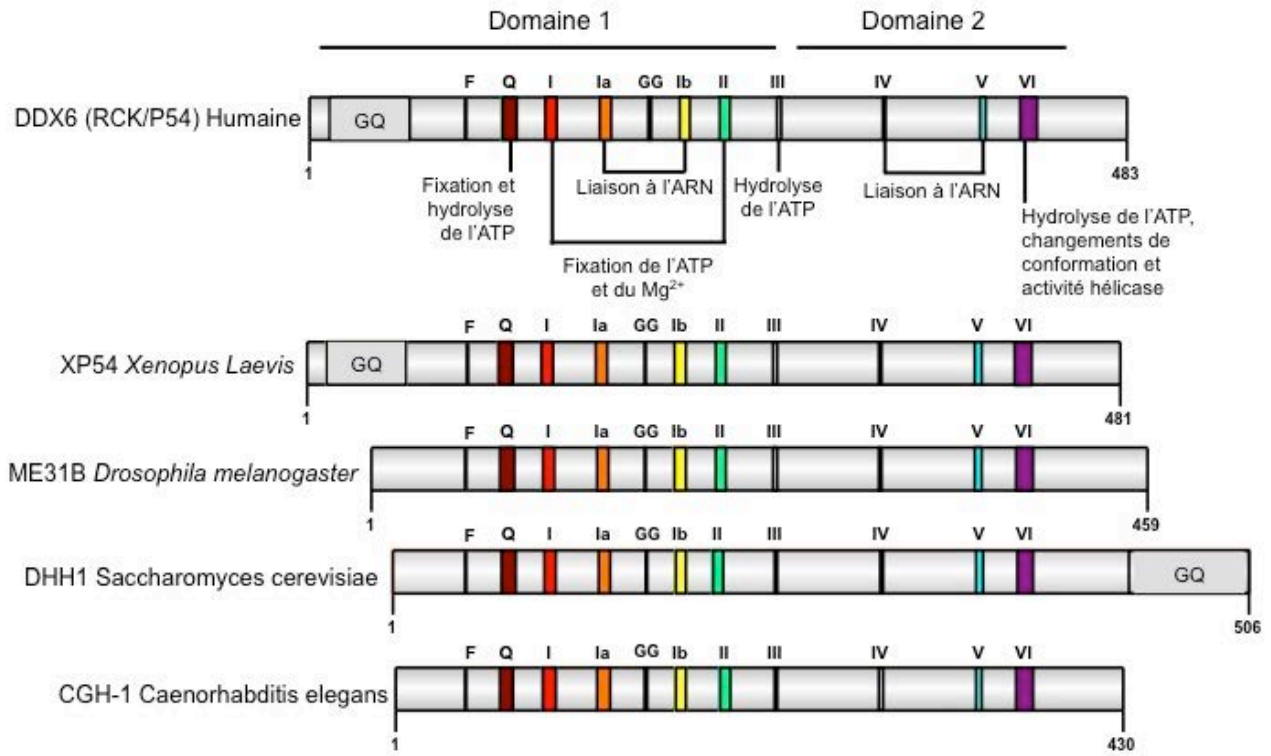
2.2. Structure de l'hélicase DDX6

DDX6 a été cristallisée en premier lieu chez la levure (Cheng et al., 2005). Cette étude montre que comme les autres hélicases à motif DEAD, DDX6 contient 9 motifs conservés portés par deux domaines RecA-like (D1 et D2). Néanmoins ces deux domaines sont arrangés de façon originale. En effet, au sein de la protéine DDX6, le motif V interagit avec les motifs I et Q, permettant de connecter les domaines D1 et D2. De façon intéressante, des analyses du potentiel électrostatique à la surface de la protéine mettent en évidence une surface de liaison à l'ARN composée de résidus portés par les deux domaines. Cette conformation spéciale prise par DDX6 et permettant le rapprochement entre les deux domaines de la protéine pourrait donc être nécessaire pour la liaison de cette protéine à l'ARN. DDX6 a également été cocrystallisée avec des facteurs de répression et de décoiffage des ARNm, apportant des informations sur ses interactions avec ces partenaires protéiques (**Figure 15B**) (Sharif et al., 2013a). Nous détaillerons ces interactions dans les chapitres traitant de l'implication de DDX6 dans la répression et la dégradation des ARNm.

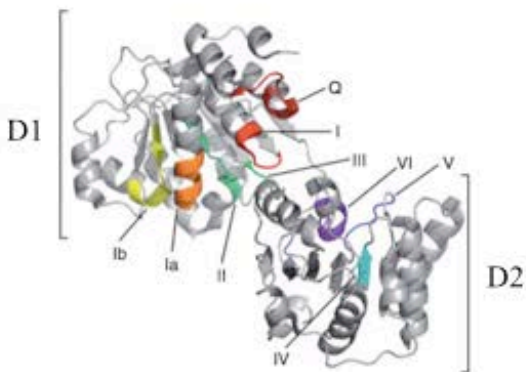
La protéine DDX6 humaine contient également une région riche en glycine et en asparagine en N-terminal, en amont du motif Q. Cette séquence est conservée chez le xénope

en N-terminal, et chez la levure en C-terminal (**Figure I5A**). Elle s'apparente aux séquences portées par la protéine prion, séquences responsables de son auto-agrégation. C'est pourquoi notre équipe s'est intéressée à savoir si DDX6 s'auto-agrégeait *in vitro*. Quoique sur gel natif, la protéine DDX6 purifiée et traitée à la RNase forme plusieurs bandes, l'absence de bandes hautes dans le gel montre que DDX6 ne s'auto-agrège pas. Ces observations montrent en revanche que DDX6 s'oligomérisse sous forme de monomère, dimère et trimère, indépendamment de la présence d'ARN (Ernoult-Lange et al., 2012). De plus, le profil de migration de la protéine DDX6 déléetée de la région riche en glycine et en asparagine montre que le motif « prion-like » porté par la protéine n'est pas nécessaire à son oligomérisation.

A



B



C

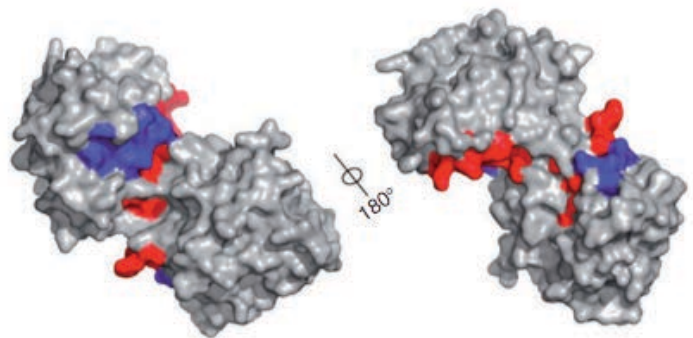


Figure I 5 : Organisation et arrangement des domaines portés par l'hélicase à motif DEAD DDX6

(A) Motifs conservés de DDX6 au sein de divers organismes. (B) Structure de la protéine DDX6 cristallisée chez *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 4BRU) de Sharif et al., 2013. (C) Représentation en surface de DDX6, avec les motifs impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP en rouge, et les motifs qui contribuent à la liaison à l'ARN en bleu.

En termes de fonction, DDX6 contribue à la répression de la traduction d'ARNm spécifiques ainsi qu' à la répression globale de la traduction des ARNm et à la dégradation de ces derniers. DDX6 participe également à la voie de régulation des microARN. Au vu de ces diverses fonctions au sein de différents organismes, DDX6 semble être un acteur important dans la régulation de l'expression des gènes. C'est ce que nous verrons dans la suite de cette introduction.

3. Répression de la traduction des ARNm

3.1. Exemples de mécanismes de contrôle de l'initiation de la traduction

Certains mécanismes moléculaires permettent de réduire l'efficacité générale de la traduction en inhibant l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction sur l'ARNm, ou *via* des petites séquences appelées uORFs.

3.1.1. Phosphorylation du facteur d'initiation eIF2

En conditions classiques, eIF2B permet l'échange d'eIF2-GDP en eIF2-GTP, entraînant la formation d'un nouveau complexe ternaire eIF2-TC (eIF2-GTP-ARNt). En conditions de stress, une des quatre kinases HRI (***H**aem- **R**egulated-**I**nhibitor*), GCN2 (***G**eneral **C**ontrol **N**ondepressible **2***), PKR (***P**rotéine **K**inase activée par l'**A**RN double brin*) ou encore PERK (***P**KR-like **E**ndoplasmic **R**eticulum **K**inase*) phosphoryle la sous-unité α du facteur eIF2-GDP sur le résidu serine 51. Or eIF2B a une plus forte affinité pour la forme eIF2-GDP phosphorylée, ce qui empêche sa dissociation, inhibant ainsi la formation d'un nouveau complexe eIF2-TC. Cette inhibition réduit donc l'efficacité générale de la traduction (Holcik and Sonenberg, 2005).

3.1.2. Inhibition de l'assemblage du complexe eIF4F à la coiffe des ARNm

Les protéines 4E-BP1, 4E-BP2, et 4E-BP3 (***eIF4E Binding Protein***) inhibent la traduction de façon indirecte, en régulant la disponibilité du facteur eIF4E. Lorsqu'elles sont hypophosphorylées, les 4E-BP s'associent à eIF4E, inhibant ainsi l'association entre eIF4E et

eIF4G et l'association du complexe eIF4F à la coiffe des ARNm (**Figure I6**). L'initiation de la traduction est ainsi inhibée de façon générale (Richter and Sonenberg, 2005).

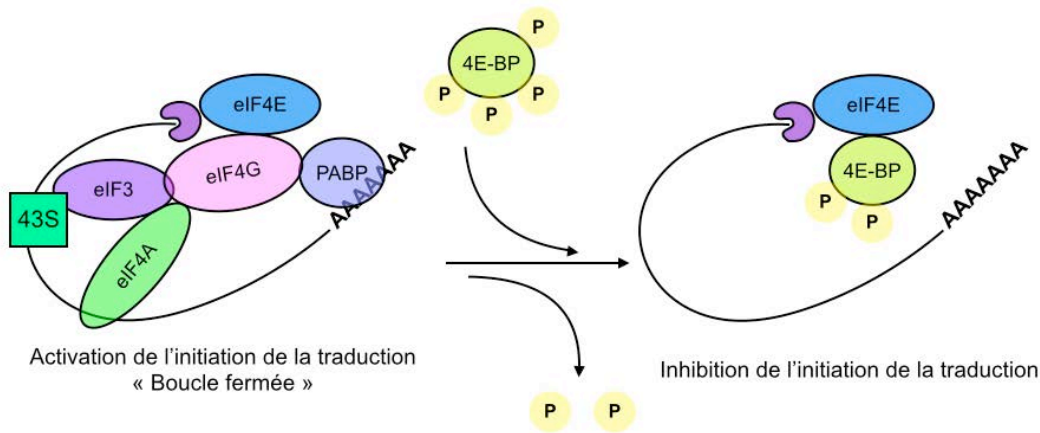


Figure I 6 : Un modèle d'inhibition de la traduction

La phosphorylation d'autres facteurs d'initiation (eIF1, eIF2, eIF3, eIF4G, eIF4B, eIF4H, eIF5 et eIF5B) a également été corrélée avec une augmentation de l'activité de traduction, même si à ce jour, il n'y a pas de démonstration claire des mécanismes moléculaires sous-jacents.

3.1.3. Régulations de la traduction via les uORFs

Les uORFs (*Upstream Open Reading Frames*) sont des petits cadres ouverts de lecture présents dans la région non traduite 5'UTR des ARNm en amont du codon d'initiation AUG. Comme nous l'avons vu, lors de l'initiation de la traduction, le 43S PIC se fixe au niveau de la coiffe en 5' des ARNm, et les balaye jusqu'à identifier le codon d'initiation de l'ORF. Les uORF peuvent perturber l'efficacité de traduction des séquences codantes. En effet, lorsqu'un ribosome rencontre une uORF en amont de la séquence codante, il peut traduire l'uORF et y rester bloqué entraînant la dégradation de l'ARNm ou bien traduire l'uORF et réinitier la traduction de l'ORF (Calvo et al., 2009). Dans certains cas, le ribosome balaye l'ARNm sans tenir compte de l'uORF, leur présence sur l'ARNm n'ayant alors aucun effet sur l'efficacité de traduction de l'ARNm ciblé. Ces uORFs sont présentes dans 49% des ARNm humains et sont conservées à travers les espèces (Barbosa et al., 2013).

3.2. Rôle des RBPs (*RNA-Binding Proteins*) dans la régulation de la traduction

3.2.1. Mécanismes de régulation de la traduction par la PABPC1

Nous avons déjà parlé de la conformation en « boucle fermée » prise par l'ARNm lors du rapprochement entre la coiffe et la queue poly(A), orchestrée par la PABPC1, stimulant l'initiation de la traduction (partie 1.2.1). Néanmoins, par son interaction avec les protéines PAIP1, PAIP2A et PAIP2B, PABPC1 peut également réguler la traduction. Ces protéines s'associent à la PABP *via* des motifs PAM sur lesquels se lie habituellement la protéine eIF4G. L'interaction entre PABPC1 et eIF4G est ainsi inhibée (Eliseeva et al., 2013). La traduction n'est pas inhibée lorsque PAIP1 s'associe à PABPC1 puisque PAIP1 acquiert une affinité pour eIF4A permettant le déroulement des structures secondaires présentes en 5'UTR, et donc l'initiation de la traduction. En revanche, lorsque PAIP2A et PAIP2B lient la PABPC1, cette dernière ne peut plus se lier à la queue poly(A), à eIF4G et à PAIP1, ce qui conduit à l'inhibition de la traduction (Khaleghpour et al., 2001). Une autre étude a montré que l'excès de PABP inhibait la traduction *in vitro*. Cette observation mène à l'hypothèse que la PABPC libre dans le cytoplasme interagit avec eIF4F, ce qui empêche le complexe ARN-poly(A)-PABP-eIF4G de s'associer à eIF4E, provoquant l'inhibition de la traduction (Eliseeva et al., 2013).

3.2.2. Mécanisme de formation d'une « boucle fermée » inhibitrice de la traduction des ARNm

La régulation de la traduction d'ARNm spécifiques est possible par l'inhibition de la fixation du facteur d'initiation eIF4E à la coiffe ou par l'inhibition de l'interaction entre eIF4E avec eIF4G comme nous l'avons vu en 3.1.2 (Kong and Lasko, 2012). Les exemples les mieux connus de ce type de régulation en « boucle fermée » inhibitrice fonctionnent pour la plupart selon le même mécanisme moléculaire (**Figure I7**). Les ARNm ainsi régulés portent des motifs particuliers présents dans leur séquence en 3'UTR, sur lesquels peut se fixer une protéine X. Cette régulation implique 2 autres protéines, Y et Z, et entraîne également un changement de conformation de l'ARNm en « boucle fermée » inhibitrice qui perturbe l'association du ribosome à l'ARNm, bloquant ainsi la traduction (Jackson et al., 2010a). La protéine Y fonctionne comme un intermédiaire entre les protéines X et Z.

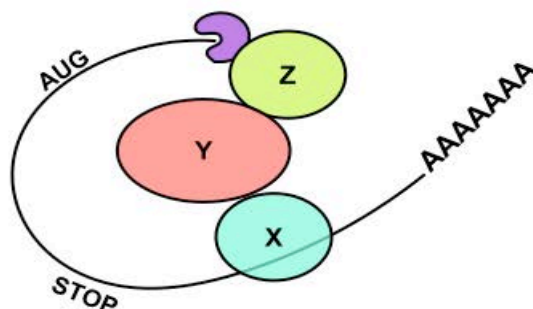


Figure I 7 : Modèle de répression de la traduction des ARNm

Des motifs en 3'UTR de certains ARNm permettent le recrutement d'une protéine X. La formation de cette boucle implique 2 autres protéines Y et Z contribuant au changement de conformation de l'ARNm en « boucle fermée » inhibitrice.

Organisme	ARNm	Protéine X	Protéine Y	Protéine Z
<i>Xénopus laevis</i> Ovocytes	Cyclin B1	CPEB1	4E-T	eIF4E1b (EIF4E chez l'Homme)
<i>Drosophila melanogaster</i> Embryons	Nanos	Smaug	CUP	eIF1a (EIF4E chez l'Homme)
	Oskar	Bruno	CUP	eIF1a (EIF4E chez l'Homme)
	Caudal	Bicoid	Bicoid	4EHP (EIF4E2 chez l'Homme)
	Hunchback	Nanos, Pumilio et Brat	Nanos, Pumilio et Brat	4EHP (EIF4E2 chez l'Homme)

Figure I 8 : Tableau de modèles de répression décrits chez le xénope et chez la drosophile

Le tableau ci-dessus présente des exemples connus de complexes de répression de la traduction suivant le modèle présenté (**Figure I8**).

Dans la plupart des cas connus, Y correspond à la protéine CUP ou à son homologue 4E-T (le transporteur d'eIF4E) chez les vertébrés. La protéine Z correspond souvent au facteur d'initiation eIF4E (aussi appelé eIF4E1a). Dans l'embryon de drosophile, 4EHP

inhibe la traduction de l'ARNm caudal par son interaction avec le facteur Bicoid qui s'associe à l'ARNm via les séquences « BBR » (Niessing et al., 2002). Dans ce cas, Bicoid correspond aux protéines X et Y. 4EHP régule également l'ARNm hunchback en interagissant avec le complexe multi-protéique Nanos, Pumilio et Brat (Cho et al., 2006). Dans l'ovocyte de Xénope, la protéine eIF4E-T (Y) réprime la traduction des ARNm maternels en s'associant à la protéine CPEB1 (X) (*Cytoplasmic Polyadenylation Elements Binding protein 1*) (Minshall et al., 2007).

3.2.3. Un exemple de complexe de répression de la traduction impliquant DDX6 : le complexe CPEB

La protéine CPEB1 (*Cytoplasmic Polyadenylation Elements protein 1*) a été caractérisée chez diverses espèces dont le xénope, la drosophile (ORB), la palourde (p82), le nématode (CPB1-4), la souris (CPEB1-4), l'Homme (CPEB1-4) et le poisson zèbre (ZORBA). Différentes études suggèrent que les protéines CPEB1-4 appartiennent à différentes classes de protéines. D'une part, une étude d'alignement de séquences et de prédiction de fonctions montre que CPEB1 est distante des protéines CPEB 2-4 en terme d'évolution (Wang and Cooper, 2010). Néanmoins, une étude récente montre que CPEB2 et CPEB4 reconnaissent les mêmes sites CPE que CPEB1 sur l'ARNm, avec une moins forte affinité (Fernández-Miranda and Méndez, 2012). CPEB2 réprime la traduction dans les cellules somatiques en inhibant l'élongation en interagissant avec le facteur d'élongation eEF2. De plus, CPEB3 orchestre la répression de la traduction dans les neurones (Huang et al., 2006; Mendez and Richter, 2001).

La protéine CPEB1 contient en son domaine C-terminal deux motifs de reconnaissance de l'ARN appelés RRM (*RNA Recognition Motif*) suivis d'un domaine en doigt de zinc. Ces 3 domaines sont responsables de l'association de la protéine aux sites de fixation CPE (*Cytoplasmic Polyadenylation Elements*), U₄₋₆A₁₋₃U, présents dans la région 3'UTR de certains ARNm maternels (Standart and Minshall, 2008). Par sa liaison avec les sites CPE, la protéine CPEB1 peut exercer deux fonctions distinctes : réprimer la traduction des ARNm maternels dans les ovocytes de xénope, ou activer leur traduction dans les œufs matures en induisant la polyadénylation d'ARNm. Plusieurs études ont également montré l'importance de la protéine CPEB1 dans la régulation de la traduction chez la souris, la drosophile et chez *Caenorhabditis elegans* (Chang et al., 1999; Gebauer and Richter, 1996;

Luitjens et al., 2000).

Dans l'ovocyte de xénope, deux protéines du complexe CPEB, PARN (*Poly(A)-specific Ribonuclease*) et GLD2 (*Poly(A) RNA polymerase GLD2*), contrôlent des activités opposées : la déadénylase PARN dégrade une grande partie de la queue poly(A), alors que la poly(A) polymérase GLD2 synthétise la queue poly(A) (Kim and Richter, 2006). Puisque PARN est plus active que GLD2 dans les ovocytes de xénope, la queue poly(A) est raccourcie dans les ovocytes, favorisant la répression de la traduction. Lorsque l'ovocyte est mature, la phosphorylation de CPEB1 par la kinase Aurora B entraîne l'expulsion de PARN du complexe CPEB, permettant à GLD2 d'assurer son activité d'élongation de la queue poly(A), en accord avec l'activation de la traduction (Kim and Richter, 2006; Mendez et al., 2000).

Pendant l'ovogenèse précoce chez le xénope, la protéine CPEB1 est en réalité impliquée dans un complexe multiprotéique (**Figure I9**). C'est ce complexe qui assure la répression des ARNm déadénylés. Il rassemble plusieurs protéines formant un complexe RNP d'environ 5 MDa, comme le montrent des expériences de coprécipitation et de gel filtration (Minshall et al., 2007) :

eIF4E (eIF4E1b chez le xénope)

La protéine eIF4E1b est exprimée principalement au stade précoce de l'ovogenèse chez le xénope. eIF4E1b se lie au répresseur de la traduction 4E-T, mais n'interagit pas avec le facteur d'initiation eIF4G (Minshall et al., 2007). eIF4E1b pourrait donc empêcher la formation d'une « boucle fermée » activatrice, inhibant ainsi l'initiation de la traduction (Minshall et al., 2007).

4E-T

4E-T, le transporteur du facteur d'initiation eIF4E, est également un composant du complexe CPEB. Lorsque cette protéine est artificiellement liée à un ARNm rapporteur dans l'ovocyte de xénope et dans les cellules humaines (tethering), sa traduction est réprimée (Kamenska et al., 2014; Minshall et al., 2007). Son activité de répresseur est conservée chez la drosophile, assurée par la protéine CUP. Lorsque CPEB1 fonctionne tel un répresseur de la traduction dans les ovocytes, elle interagit avec la protéine 4E-T. Cette interaction empêche

l'association d'eIF4E à eIF4G et réprime ainsi la traduction. L'association d'eIF4E et eIF4G est restaurée dans l'œuf mature, par la phosphorylation de 4E-T qui libère eIF4E, permettant aux ARNm précédemment réprimés d'être à nouveau traduits (Standart and Minshall, 2008).

LSM14A et B (RAP55B chez le xénope)

La protéine RAP55B (*RNA-Associated Protein of 55 KDa*) fait partie de la famille des protéines Lsm (*Like-Sm*) portant un motif Sm présent dans un large champs de protéines appelées LSM14 ou Scd6 (*Supressor of clathrin deficiency 6*) (Albrecht and Lengauer, 2004). Chez les vertébrés, la famille LSM14 a évolué en deux paralogues, LSM14A et LSM14B, la différence fonctionnelle entre ces deux protéines n'étant pas clairement élucidée (Marnef et al., 2009). Leur domaine Lsm est impliqué dans la reconnaissance de l'ARN. Elles portent également des répétitions RGG responsables des interactions ARN-protéine ou protéine-protéine, ainsi qu'un motif FDF en C-terminal sur lequel nous reviendrons plus tard.

PAT1 (XPAT1A chez le xénope)

La protéine PAT1 (*Protein Associated with Topoisomerase II*) est conservée chez tous les eucaryotes. Il existe deux isoformes chez les vertébrés, PAT1A et PAT1B, alors qu'une seule protéine PAT1 est présente chez la levure (PAT1) et les invertébrés (Marnef et al., 2012). Elle est impliquée dans diverses fonctions liées au métabolisme de l'ARNm. Chez la levure, par ses interactions avec les protéines eIF4E, eIF4G, PABP1, et les sous-unités ribosomales dans les polysomes, PAT1 participe à l'initiation de la traduction (Bonnerot et al., 2000; Tharun and Parker, 2001; Wyers et al., 2000). De plus, chez la levure et le xénope, PAT1 est impliquée dans la répression de la traduction (Coller and Parker, 2005a; Marnef et al., 2010; Nakamura et al., 2010). Même si elle participe au complexe de répression de la traduction, chez la levure, la drosophile et l'Homme, PAT1 entraîne également la déadénylation et le décoiffage des ARNm, menant à la dégradation de ces derniers (Braun et al., 2010; Haas et al., 2010; Hatfield et al., 1996; Ozgur et al., 2010; Totaro et al., 2011).

ePAB

ePAB est exprimée dans les ovocytes de xénope, et se lie à la queue poly(A) et à eIF4G (Guzeloglu-Kayisli et al., 2008). Plusieurs études suggèrent que cette protéine a un rôle

important dans l'activation de la traduction des ARNm maternels chez les mammifères et dans les ovocytes de xénope. En effet, lorsqu'elle est liée artificiellement à un ARNm rapporteur, ePAB active sa traduction dans les ovocytes de xénope (Wilkie et al., 2005). Cela étant contradictoire avec la fonction de répression de la traduction des autres protéines du complexe CPEB, la raison de sa présence au sein de ce complexe n'est pas clairement élucidée. Néanmoins, des études proposent qu'en se liant à la queue poly(A) des ARNm, ePAB stabilise les protéines du complexe de répression CPEB à l'ARNm ciblé (Kim and Richter, 2007; Minshall et al., 2009). De plus, Minshall et al., 2009 montrent que le complexe répresseur limite le recrutement de ePAB, conduisant à la diminution du taux de traduction.

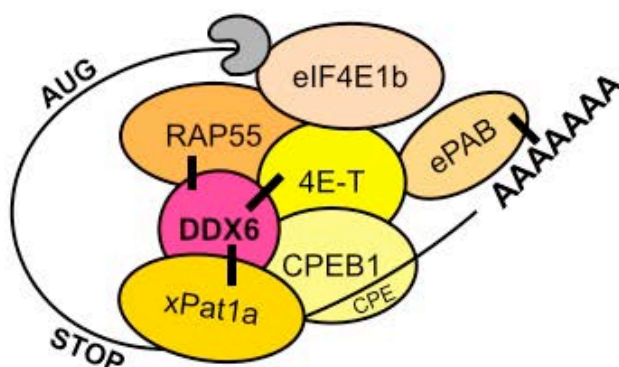


Figure I 9 : Complexe de répression de la traduction CPEB chez le xénope

CPEB1 interagit avec la protéine 4E-T et empêche l'association d'eIF4E1b à eIF4G. Les traits noirs représentent les interactions directes démontrées dans la littérature.

3.2.4. Implication de DDX6 dans la répression de la traduction des ARNm

3.2.4.1. Interactions entre DDX6 et les protéines impliquées dans la répression de la traduction

Interaction entre DDX6 et PAT1

La cocrystallisation des protéines DDX6 et PAT1 chez la levure (DHH1 et PAT1 respectivement) a montré que DDX6 porte une poche au niveau de son domaine D2 en C-terminal, qui reconnaît un court motif FDF présent sur la protéine PAT1 (Sharif et al., 2013)

ainsi que sur le facteur de décoiffage des ARNm EDC3 (Tritschler et al., 2009), facteur dont nous reparlerons plus tard.

Chez l'Homme (PAT1B) et la drosophile (HPAT), le motif FDF de la protéine PAT1 n'est pas conservé. Les alignements de séquences démontrent néanmoins la présence d'un motif DW sur la protéine PAT1 chez ces organismes, ayant la même localisation que le motif FDF de PAT1 chez la levure (Sharif et al., 2013b).

L'interaction entre DDX6 et le motif DW de PAT1 a donc été analysée dans les cellules humaines. La protéine HA-DDX6 et un domaine de 84 acides aminés de la protéine PAT1B contenant le motif DW étiqueté YFP ont été cotransfectés, et ils coprécipitent. De plus, des substitutions sur le site DW de PAT1 inhibent partiellement l'interaction entre DDX6 et PAT1B (Ozgur and Stoecklin, 2013), suggérant que PAT1 interagit avec DDX6 *via* son motif DW. La même observation est faite lorsque le site de liaison au motif FDF porté par DDX6 est muté (mutant appelé mut1). L'interaction de PAT1 avec le site de liaison spécifique au motif FDF porté par DDX6 chez la levure est donc conservée chez l'Homme. Chez la drosophile, des expériences de coprécipitation montrent que l'interaction entre DDX6 et PAT1 est également conservée (Coller et al., 2001; Eulalio et al., 2007; Minshall et al., 2007).

Interaction entre DDX6 et LSM14A

Chez la drosophile, un fragment de la protéine LSM14A (Tral) comprenant un motif FDF coimmunoprécipite avec DDX6 (Tritschler et al., 2008). En substituant n'importe quel résidu du motif FDF de LSM14A, l'interaction entre LSM14A et DDX6 est inhibée, indiquant que LSM14A interagit bien avec DDX6 *via* son motif FDF (Tritschler et al., 2009). Cette interaction est conservée dans l'ovocyte de xénope et chez *Caenorhabditis elegans* (Tanaka et al., 2006).

Ces études montrent donc que LSM14A, EDC3 et PAT1 interagissent *via* le même site porté par DDX6.

3.2.4.2. Implication fonctionnelle de DDX6 dans la répression de la traduction des ARNm

L'implication fonctionnelle de DDX6 dans la répression de la traduction des ARNm a été montrée au sein de divers organismes. Lorsque DDX6 est liée artificiellement à un ARNm rapporteur (tethering) dans l'ovocyte de xénope, sa traduction est réprimée (Minshall et al., 2009). Des études décrivent DDX6 comme un répresseur général ou spécifique de la traduction.

DDX6, répresseur général de la traduction

Dans les cellules humaines HeLa, le taux de traduction a été déterminé par mesure de l'incorporation de méthionine radioactive [S^{35}] après inhibition de l'expression de DDX6. Le taux d'incorporation de la méthionine est significativement supérieur dans les cellules dans lesquelles l'expression de DDX6 est diminuée. Cette observation montre que l'inhibition de l'expression de DDX6 entraîne une augmentation générale de l'activité de traduction indiquant que DDX6 est un répresseur général de la traduction dans les cellules HeLa (Chu and Rana, 2006; Jangra et al., 2010).

En accord avec ces observations, la surexpression de DDX6 chez la levure mène à une répression générale de la traduction, indépendamment du complexe CPEB qui n'est pas présent dans cet organisme (Coller and Parker, 2005).

DDX6, répresseur d'ARNm spécifiques

Un premier exemple a été montré dans les gamétocytes femelles du plasmodium, précurseurs des gamètes femelles. Au sein de ces gamétocytes, une grande quantité de transcrits est réprimée. C'est le cas par exemple des ARNm p25 et p28 qui codent des protéines essentielles pour le développement du zygote et dont la traduction, hautement régulée, doit être initiée après fertilisation (Mair et al., 2006). Lorsque DDX6 (DOZI chez le plasmodium) est déplétée avant la fertilisation, le nombre de transcrits p28 et p25 réprimés est réduit de façon significative, démontrant le rôle central de DDX6 dans la répression d'ARNm spécifiques à ce stade du développement. En complément, des expériences de FISH (*Florescence In Situ Hybridisation*) ont permis d'observer la colocalisation des transcrits p28 et p25 avec DDX6 dans des granules mRNPs. Cette incapacité du parasite à stocker sous

forme réprimée certains ARNm spécifiques mène à l'arrêt du développement du zygote, montrant l'importance de l'activité de régulation de DDX6 chez le plasmodium (Mair et al., 2006).

Un second exemple a été montré chez *C. elegans*, au sein duquel l'ARNm maternel nos-2 est traduit prématurément en absence de DDX6 (CGH-1) durant l'ovogenèse, suggérant que DDX6 est nécessaire à la répression de nos-2 (Gallo et al., 2008). De plus, DDX6 interagit *via* l'ARNm avec GLD-1 (*Female germline-specific tumor suppressor*), une protéine impliquée dans la répression des ARNm (Scheckel et al., 2012). DDX6 stabilise un grand nombre d'ARNm lorsqu'elle est associée à GLD-1. Enfin, l'association entre DDX6 et GLD-1 semble être d'importance majeure dans le développement de l'embryon, puisque les ARNm stabilisés par cette association codent pour des protéines assurant une fonction critique dans la transition ovocyte-embryon (Scheckel et al., 2012).

Motifs conservés de DDX6, impliqués dans son activité de répression de la traduction des ARNm

Pour mettre en évidence les motifs impliqués dans l'activité de répression de la traduction de DDX6 dans les ovocytes de xénope, une expérience de tethering a été réalisée avec la protéine DDX6 mutée sur les motifs I (DILARAK > DILAAAA), motif III (SAT > AAA), motifs II (DEAD > DQAD) ou VI (HRIGR > HRIGQ). La traduction de l'ARNm rapporteur est 3 à 9 fois plus élevée dans les ovocytes exprimant l'une de ces 4 versions mutées de DDX6, en comparaison avec l'activité de traduction mesurée dans les ovocytes exprimant la protéine DDX6 sauvage (Minshall et al., 2009). Ces observations mettent en évidence l'importance de ces 4 motifs dans l'activité de répression de DDX6.

Au vu de ces résultats, cette étude s'est également intéressée à comprendre l'influence de ces mutations sur les interactions entre DDX6 et ses partenaires protéiques par des expériences de coprécipitation. Ces mutations entraînent toutes une augmentation de l'interaction entre l'activateur de traduction ePAB et DDX6, observation cohérente avec l'augmentation du taux de traduction dans l'expérience de tethering.

Enfin, l'activité de répression de chacun des domaines D1 et D2 de DDX6 a été testée. Aucun effet sur la traduction de l'ARNm rapporteur n'est observé lorsque seul le domaine D1

est artificiellement lié à ce dernier. En revanche, le domaine D2 de DDX6 réprime aussi bien la traduction de l'ARNm rapporteur que la protéine DDX6 entière. Au vu de ces observations, le domaine D2 de DDX6 est suffisant pour assurer sa fonction de répresseur de traduction des ARNm.

3.2.5. Autre exemple de mécanisme de répression de la traduction des ARNm impliquant DDX6

Un mécanisme particulier de régulation de la traduction a été étudié durant l'érythropoïèse. Brièvement, les pré-érythroblastes se différencient en érythroblastes dans la moelle osseuse, puis en réticulocytes après expulsion du noyau, et enfin en érythrocytes dépourvus d'organelle à leur libération dans le sang. C'est au niveau de la moelle osseuse, au stade d'érythroblaste que les ARNm sont synthétisés. Ceux qui ne sont pas traduits à ce stade sont stockés sous forme de particules RNP réprimées. L'étape clé de la maturation des réticulocytes anucléés en érythrocytes matures est la dégradation des mitochondries. Cette dégradation est orchestrée par l'enzyme r15-LOX qui catalyse l'oxygénation des phospholipides composant la membrane des mitochondries (Grüllich et al., 2001). Du fait de son importance dans la régulation de la différenciation des réticulocytes en érythrocytes, la traduction de l'ARNm r15-LOX est hautement régulée dans le temps. Ce sont les protéines hnRNP K (*H*eterogeneous *n*uclear *r*ibonucleoprotein *K*) et hnRNP E1 qui inhibent, en complexe ou séparément, la traduction de l'ARNm r15-Lox, en se fixant aux DICE (*D*ifferentiation *C*ontrol *E*lement) portés en 3'UTR de cet ARNm. Le complexe hnRNP K/E1-DICE empêche l'assemblage des sous-unités 60S et 40S du ribosome lors de l'initiation de la traduction. DDX6 est recrutée par le complexe hnRNP K/E1 lié à une séquence DICE, pour réprimer la traduction de l'ARNm r15-lox dans les érythrocytes. De plus, l'interaction de DDX6 avec hnRNP K/E1 se fait *via* l'ARNm (Naarmann et al., 2010).

4. Stabilité des ARNm

Dans le cytoplasme, les transcrits ont 3 destins possibles. Comme nous l'avons vu précédemment, ils peuvent être traduits et réprimés. Ces ARNm peuvent également être dégradés. La dégradation des ARNm dépendante de la déadénylation, que nous allons détailler ci-après, constitue une régulation post-transcriptionnelle majeure dans le contrôle de

l'expression des gènes chez les eucaryotes. C'est chez *Saccharomyces cerevisiae* qu'elle a été le plus étudiée.

Différentes voies de dégradation existent et toutes sont assurées par des nucléases accompagnées de facteurs modulant leur fonction. Les voies principales de dégradation des ARNm incluent la dégradation 5'-3' assurée par l'exonucléase XRN1 et la dégradation 3'-5' assurée par l'exosome (Coller and Parker, 2004). Chez les eucaryotes, ces deux voies majeures de dégradation débutent par le raccourcissement de la queue poly(A) en 3' des ARNm : c'est la déadénylation (Muhlrad and Parker, 1992).

4.1. Déadénylation des ARNm

Chez les eucaryotes, 3 complexes enzymatiques orchestrant la déadénylation des ARNm ont été caractérisés : Les enzymes PAN2 et PAN3 (*Poly(A) Nucléase 2 et 3*) formant le complexe PAN, les déadénylases CCR4 et POP2 (aussi appelée CAF1) du complexe CCR4-NOT, et PARN (*Poly(A) Ribonucléase*) (Brown and Sachs, 1998). Toutes ces enzymes font partie de la famille des RNase D, exoribonucléases ayant une activité 3'-5' (Boeck et al., 1996) (**Figure I10**).

4.1.1. Le complexe PAN

Le premier complexe à intervenir dans la déadénylation est le complexe PAN. Au sein de ce complexe, l'enzyme PAN2 porte l'activité catalytique et PAN3 régule son activité. A l'aide de PAN3, PAN2 catalyse donc le raccourcissement de la queue poly(A) d'environ 200 à 110 adénosines chez les mammifères, et de 90 à 70 adénosines chez la levure (Uchida et al., 2004). La suite de la déadénylation des ARNm est assurée par le complexe CCR4-NOT.

4.1.2. Le complexe CCR4-NOT

Chez la levure, le complexe CCR4-NOT est constitué de 2 exonucléases 3'-5', CCR4 et POP2 (ou CAF1) qui interagissent entre elles de façon directe (Clark et al., 2004) Elles sont accompagnées des protéines NOT1, NOT2, NOT3, NOT4, NOT5, CAF40 et CAF130 (Denis and Chen, 2003).

Dans les cellules humaines, la protéine CCR4 a deux orthologues CCR4A/CNOT6 et CCR4B/CNOT6L et il en est de même pour POP2 avec CAF1A/CNOT7 et POP2/CNOT8 (Aslam et al., 2009). Des travaux montrent que CAF1/CNOT7 et POP2/CNOT8 sont identifiés dans des complexes CCR4-NOT distincts chez l'Homme (Lau et al., 2009). Il en est de même pour les déadénylases CAF1/CNOT7 et POP2/CNOT8. Ces enzymes sont accompagnées des protéines CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT4, CNOT9 (CAF40 chez la levure) et CNOT10 (CAF130), NOT5 n'étant pas conservée chez l'homme.

Chez la levure, l'activité catalytique du complexe CCR4-NOT est assurée principalement par l'enzyme CCR4. En effet, une mutation du site actif de l'enzyme CCR4 entraîne une inhibition complète de la déadénylation d'ARNm rapporteurs (Tucker et al., 2001). En revanche, une mutation au niveau du site actif de l'enzyme POP2 n'altère pas l'activité de déadénylation du complexe CCR4-NOT. Néanmoins, les mutants n'exprimant pas la protéine POP2 présentent un défaut de déadénylation, mettant en évidence l'importance de l'interaction entre CCR4 et POP2 dans l'activité exonucléolytique du complexe CCR4-NOT (Chen et al., 2002; Goldstrohm et al., 2007; Tucker et al., 2002). En revanche, chez la souris, la drosophile, l'homme et le xénope, l'activité déadénylase des homologues de POP2 a été démontrée. Elle serait même l'enzyme prédominante du complexe CCR4-NOT chez certains métazoaires (Bianchin et al., 2005; Cooke et al., 2010). Enfin, le rôle des protéines NOT, CAF40 et CAF130 dans l'activité de déadénylation de ce complexe n'est pas encore bien compris. Une hypothèse est qu'elles servent d'adaptateurs au complexe CCR4-NOT pour se lier aux ARNm (Tucker et al., 2002).

4.1.3. La protéine PARN

PARN est une déadénylase conservée chez de nombreuses espèces eucaryotes incluant les mammifères, le xénope, *C. elegans* et *Arabidopsis Thaliana* (Virtanen et al., 2013). C'est la seule déadénylase capable d'interagir avec la coiffe et la queue poly (A) durant l'hydrolyse de la queue poly(A). L'activité de PARN est dépendante de la coiffe, et inhibée par les PABP et les protéines se liant à la coiffe des ARNm. Particulièrement étudiée chez le xénope et les plantes, elle n'est pas conservée chez la levure.

4.1.4. Régulations de la déadénylation

La protéine PABPC1 présente sur la queue poly(A) des ARNm influence l'activité des exonucléases. En effet, en présence de PABPC1, l'action du complexe CCR4-NOT est inhibée (Tucker et al., 2002). En revanche, l'activité de PAN2 est favorisée (Boeck et al., 1996). Les complexes PAN et CCR4-NOT semblent donc fonctionner de manière séquentielle, avec PAN agissant en premier pour raccourcir la queue poly(A) et déstabiliser l'interaction entre PABPC1 et l'ARNm, CCR4-NOT achevant la déadénylation (Brown and Sachs, 1998). Le choix de la déadénylase qui exercera son activité sur un ARNm sera donc influencé par la nature des complexes protéiques présents au niveau de sa queue poly(A) ainsi que par la force de leur interaction.

Chez la levure, des défauts dans l'initiation de la traduction peuvent induire une augmentation du taux de déadénylation (Muhlrads et al., 1995). Lorsque la terminaison de la traduction est prématurée, le raccourcissement de la queue poly(A) est accéléré (Cao and Parker, 2003). Un stress environnemental (choc thermique, choc osmotique, irradiation au césium 137) peut également induire une régulation globale de la déadénylation. En effet, en condition de stress, une inhibition générale de l'activité de déadénylation par CCR4 et PAN2 est observée chez la levure et les mammifères (Gowrishankar et al., 2006; Hilgers et al., 2006). Chez la levure, les protéines PUF (*Pumilio Fem binding factor*) (PUF1, PUF2, PUF3, PUF4 ou PUF5) et notamment PUF5, se lient à des séquences spécifiques en 3'UTR de certains ARNm pour accélérer leur déadénylation (Chritton and Wickens, 2011; Ulbricht and Olivas, 2007).

4.2. Dégradation 5'-3' des ARNm

Le décoiffage des ARNm est assuré par l'holoenzyme DCP1/DCP2 (**Figure I10**). La protéine DCP2 porte l'activité catalytique, et clive la liaison pyrophosphate libérant la coiffe. Le cofacteur DCP1 qui interagit avec DCP2 stimule son activité et stabilise son interaction avec l'ARNm en changeant sa conformation (She et al., 2008).

Les ARNm sont alors dégradés de 5' vers 3' par l'exonucléase XRN1 (Muhlrads and Parker, 1994). Le site actif de XRN1 assure le déroulement des structures secondaires présentes sur l'ARNm ce qui explique pourquoi XRN1 n'a pas besoin d'être accompagnée

d'une hélicase pour exercer son activité catalytique (Jinek et al., 2011). Pour que ce modèle de dégradation fonctionne, deux critères doivent être réunis : la coiffe doit être accessible aux enzymes de décoiffage, ce qui implique le détachement préalable des facteurs d'initiation eIF4E et eIF4G de la coiffe, l'enzyme de décoiffage DCP2 doit être recrutée par l'ARNm.

Des facteurs protéiques s'associent à l'holoenzyme DCP1/DCP2 pour stimuler son activité catalytique : PAT1, EDC3, LSM14A, LSM 1-7 et DDX6. *In vivo*, 2 modèles ont été proposés. D'une part, ces facteurs peuvent stimuler l'activité de DCP1/DCP2 de façon directe. C'est le cas d'EDC3 qui stimule l'activité de décoiffage en s'associant directement à DCP2 (Harigaya et al., 2010). D'autre part, ils peuvent réprimer la traduction des ARNm, entraînant leur décoiffage sans interagir avec DCP1/DCP2. Chez la levure, DDX6 bloque la traduction avant la formation du complexe 43S PIC, induisant le décoiffage des ARNm (Nissan et al., 2010).

Enfin, la présence de PABPC1 sur la queue poly(A) des ARNm peut inhiber l'activité de décoiffage. En effet, chez la levure, le décoiffage n'a lieu que lorsque la taille de la queue poly(A) est réduite à 12 acides aminés (Brown and Sachs, 1998).

4.3. Dégradation 3'-5' des ARNm via l'exosome

Le second mode de dégradation des ARNm est catalysé par un complexe multiprotéique, l'exosome, accompagné de ses cofacteurs (Anderson and Parker, 1998).

Le cœur de l'exosome se compose de 6 RNases arrangées en anneau (RRP41, RRP42, RRP45, RRP46, Mtr3 et OIP2). Ces 6 protéines sont accompagnées de 3 protéines portant un domaine de liaison à l'ARN (RBD). Chez les mammifères, la protéine DIS3 porte l'activité endonucléolytique et exonucléolytique (Parker, 2012). Elle est accompagnée des protéines Rrp6 et DIS3L (**Figure I10**).

L'exosome est recruté sur l'ARNm qu'il va digérer de 3' en 5'. Chez la levure, l'exosome a besoin des protéines SKI (*SuperKiller*) pour dégrader les ARNm. La protéine SKI7 est liée à l'exosome *via* SKI4. Les protéines SKI2, SKI3 et SKI8 forment un complexe à part, et interagissent avec SKI7. L'interaction entre SKI7, SKI3 et SKI8 est nécessaire pour la dégradation 3'-5' des ARNm (**Figure I10**). La protéine SKI2 est une hélicase à ARN

certainement nécessaire pour dérouler les structures secondaires présentes sur les ARNm avant sa digestion, ou bien pour dissocier des protéines fixées à l'ARNm pour que l'exosome puisse à son tour être recruté (Parker, 2012). La dégradation de l'ARN s'achève par la libération de la coiffe libre, ou liée par quelques nucléotides et qui sera dans ce cas digérée par l'enzyme de clivage de la coiffe DCP Scavenger (DcpS) (Liu et al., 2002).

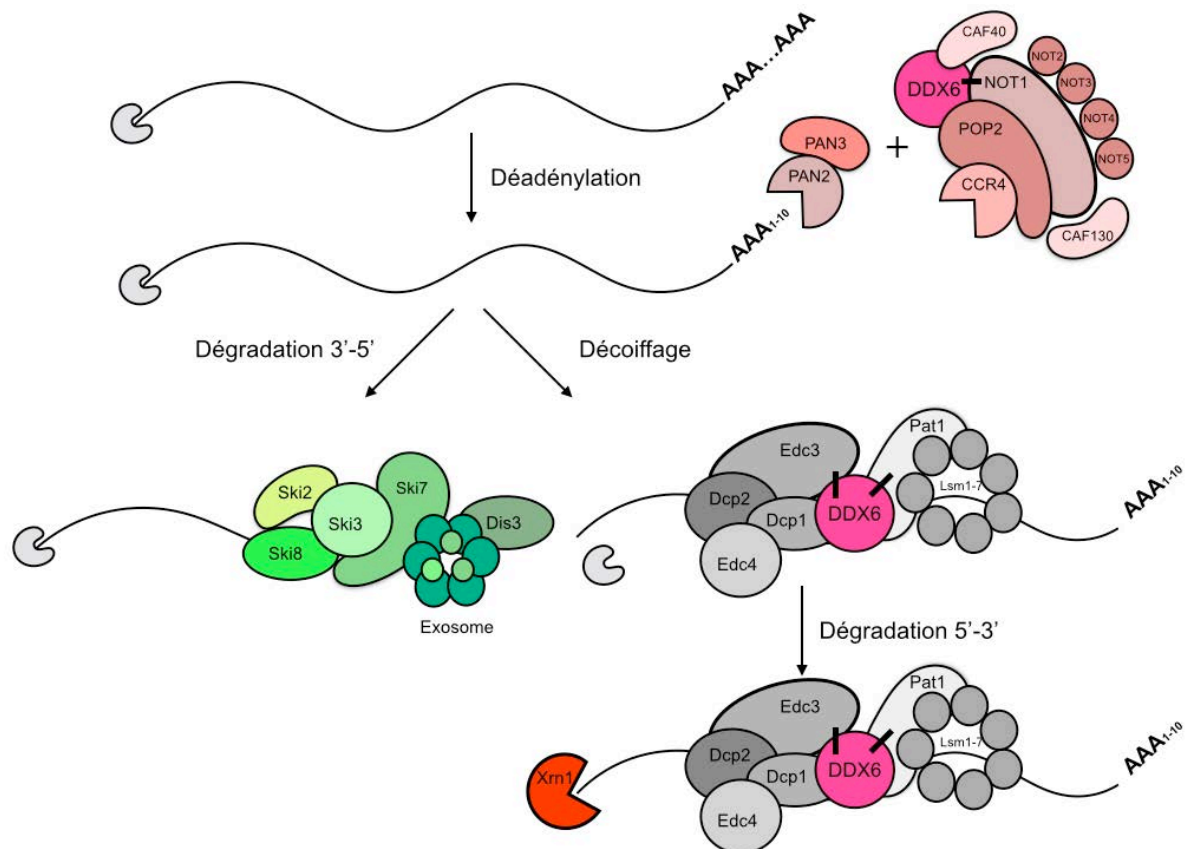


Figure I 10 : Les différentes voies de dégradation des ARNm

Les ARNm sont déadénylés puis dégradés par l'exosome de 3' vers 5' ou bien décoiffés puis dégradés par l'exonucléase XRN1 de 5' vers 3'.

4.4. Régulations de la dégradation des ARNm

4.4.1. Les AREs (AU-Rich Elements)

Les AREs ont été découverts dans la région 3'UTR d'ARNm correspondant à des cytokines (Caput et al., 1986). Ce sont des séquences constituées d'une ou plusieurs copies du motif AUUUA, insérées au sein d'une séquence riche en uracile (Helfer et al., 2012). Les ARNm présentant des AREs constituent 9% des ARNm totaux (Bakheet, 2006). Dans les cellules de mammifère, il a été montré que des protéines peuvent se lier à des séquences spécifiques ARE sur l'ARNm pour recruter l'exosome et dégrader rapidement l'ARNm ciblé (Chen et al., 2001).

La présence d'AREs en 3'UTR de ces ARNm entraîne leur dégradation par la fixation de protéines qui se lient spécifiquement à ces motifs. Alors que certaines études suggèrent que la dégradation des ARNm orchestrée par les AREs est assurée, pour une part, par des petits ARN non codants, les microARNs (voir partie 2.6), d'autres montrent que cette dégradation a lieu indépendamment de la présence de miARNs, par les voies de dégradation 3'-5' ou 5'-3' des ARNm (Helfer et al., 2012; Jing et al., 2005; Murray and Schoenberg, 2007; Stoecklin et al., 2006a).

La famille des protéines TIS11, caractérisée par la présence de deux motifs en doigt de zinc, lie spécifiquement les AREs. Parmi ces protéines, TTP (*Tristetraproline*), BRF1 et BRF2 (*Butyrate Response Factor 1 et 2*) induisent la dégradation des ARNm. Elles fonctionnent comme des adaptateurs qui connectent les ARNm contenant des AREs à l'exosome ou au complexe de decapping (Chen et al., 2001; Lykke-Andersen and Wagner, 2005; Stoecklin et al., 2006a). Une étude réalisée dans des macrophages montre que DDX6 coopère avec TTP dans cette voie de régulation (Qi et al., 2012).

4.4.2. Le contrôle qualité des ARNm dans le cytoplasme : Importance du NMD (*Nonsense Mediated Decay*)

Plusieurs mécanismes de contrôle qualité des ARNm existent dans les cellules eucaryotes, afin d'assurer la fidélité de l'expression des gènes, en protégeant la cellule contre l'accumulation d'ARNm non fonctionnels et la production de peptides anormaux. Dans le

cytoplasme, le NSD (*Non Stop Decay*) dégrade les ARNm qui sont dépourvus de codon STOP, le NGD (*No-Go-Decay*) dégrade les ARNm sur lesquels les ribosomes sont bloqués, et le NMD (*Nonsense Mediated Decay*), dont nous allons détailler le mécanisme, se charge des ARNm portant un codon STOP prématuré appelé PTC (*Premature Termination Codon*).

Le NMD est déclenché au cours du premier cycle de traduction, lorsque le premier ribosome qui traduit un ARNm est bloqué sur un PTC localisé à plus de 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon portant un EJC (Kervestin and Jacobson, 2012). Le PTC entre dans le site A du ribosome et les facteurs eRF1 et eRF3 viennent s'y fixer. Au niveau de la coiffe, la protéine CBP80 s'associe avec la protéine UPF1, un facteur clé du NMD. UPF1 et la protéine kinase SMG1 se lient aux facteurs eRF1 et eRF3, formant ainsi le complexe SURF (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3). SMG8 et SMG9 s'associent également au complexe SURF, bloquant ainsi de façon temporaire la phosphorylation d'UPF1 par SMG1. Le complexe entier (SURF-SMG8-SMG9) est alors transloqué du ribosome aux protéines UPF2 et UPF3 qui sont liées à l'EJC. Cette translocation permet la dissociation des protéines SMG8 et SMG9, entraînant l'activation d'UPF1 par sa phosphorylation orchestrée par SMG1. La protéine UPF1 phosphorylée déclenche la dissociation du ribosome de l'ARNm, inhibe l'initiation de la traduction en bloquant eIF3, et recrute les protéines SMG5, SMG6 et SMG7. Le recrutement de ces protéines entraîne la dégradation du transcrit par l'une des voies de dégradation vues précédemment (Miller and Pearce, 2014).

4.5. Implication de DDX6 dans la stabilité des ARNm

DDX6 est également impliquée dans la stabilité des ARNm en participant à leur dégradation. DDX6 interagit de façon directe avec plusieurs protéines des complexes de déadénylation et de décoiffage des ARNm, suggérant un rôle important de DDX6 dans ces complexes.

4.5.1. Interaction entre DDX6 et les protéines impliquées dans la dégradation des ARNm

DDX6 interagit avec certaines protéines du complexe de déadénylation des ARNm. Des analyses de double hybride révèlent que les protéines POP2 et DDX6 interagissent de façon directe, impliquant DDX6 dans le complexe CCR4-NOT (Coller et al., 2001; Hata et

al., 1998). De plus, des données récentes de cocristallisation et de coprécipitation montrent que DDX6 interagit de façon directe avec la protéine CNOT1 (Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014a; Rouya et al., 2014). Des mutations ponctuelles au niveau du domaine MIF4G de CNOT1 affectent fortement l'association entre CNOT1 et DDX6, montrant que l'interaction entre les deux protéines se fait par l'intermédiaire de ce domaine (Mathys et al., 2014).

De façon intéressante, l'interaction entre DDX6 et CNOT1 entraîne un changement de conformation de DDX6. En effet, lorsque DDX6 interagit avec CNOT1, les deux domaines D1 et D2 sont orientés de telle façon que les résidus de liaison à l'ARN et à l'ATP approchent d'une conformation facilitant l'activité ATPase. La conformation adoptée par DDX6 dans ce cas est comparable à la conformation prise par les protéines eIF4A en interaction avec eIF4G, conformation optimale pour l'activité ATPase (Mathys et al., 2014b). L'interaction entre CNOT1 et DDX6 stimule donc l'activité ATPase de DDX6. L'interaction entre CNOT1 et DDX6 sera rediscutée dans la partie dédiée à l'ARN interférence puisque cette interaction est importante dans la voie des microARN.

Certaines interactions suggèrent que DDX6 fonctionne comme un adaptateur du complexe de décoiffage sur l'ARNm. En effet, chez la levure, une expérience de double hybride a montré que DDX6 interagit de façon directe avec les facteurs de décoiffage DCP1, et LSM2 du complexe LSM1-7 (Uetz et al., 2000). Chez la drosophile, les peptides comprenant la région C-terminale du domaine D2 de DDX6 et le motif FDF du facteur de décoiffage EDC3 ont été cocristallisés (Tritschler et al., 2009). Ils interagissent de façon directe *via* le motif FDF d'EDC3.

L'association de DDX6 avec les facteurs de décoiffage EDC3 ou DCP1 pourrait représenter une étape importante dans l'assemblage d'un complexe multimérique impliqué dans le décoiffage des ARNm. En effet, EDC3 interagit avec l'enzyme de décoiffage DCP2 et son cofacteur DCP1 (Decker et al., 2007; Tritschler et al., 2008, 2007) et pourrait faciliter le décoiffage en positionnant DCP2 à proximité de DCP1. L'interaction entre EDC3 et DDX6 permettrait donc de charger le complexe de décoiffage sur DDX6 qui, en tant qu'hélicase, pourrait se lier à l'ARNm ciblé.

D'autre part, nous avons vu dans la partie répression de la traduction que DDX6 interagissait de façon directe par la même surface d'interaction avec LSM14A et PAT1 chez

la drosophile (Tritschler et al., 2009). En conclusion, la poche portée par DDX6 reconnaît, soit le motif FDF de LSM14A ou d'EDC3, soit le motif DW de PAT1. Les protéines PAT1, LSM14A et EDC3 ne peuvent donc probablement pas se lier à DDX6 au même moment. Nous y reviendrons à la fin de ce manuscrit.

4.5.2. Implication fonctionnelle de DDX6 dans la dégradation d'ARNm spécifiques

Chez la levure, une étude s'est intéressée au rôle de DDX6 dans la dégradation de l'ARNm correspondant à la porine (POR1), une protéine de la membrane externe de la mitochondrie permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles. La protéine RBP1P (TIAR chez l'humain) lie de façon spécifique la région 3'UTR des ARNm POR1, et entraîne leur dégradation par la voie 5'-3' de dégradation des ARNm (Buu et al., 2004).

Une autre observation montre que le niveau d'ARNm POR1 chez les levures délétées pour le gène codant pour DDX6 (Δ DDX6) augmente de façon comparable à celui des levures délétées pour le gène codant pour l'exonucléase XRN1 (Δ XRN1), suggérant que DDX6 est également impliquée dans la dégradation de l'ARNm POR1. De plus, chez les levures Δ DDX6, la surexpression de la protéine RBP1P n'a pas d'effet sur le niveau d'ARNm POR1, et le niveau d'ARNm POR1 n'est pas modifié chez les levures Δ DDX6 Δ RBP1P en comparaison avec celui observé chez les levures Δ DDX6, suggérant que DDX6 et RBP1P régulent la dégradation de l'ARNm POR1 de façon coopérative (Chang and Lee, 2012a). Enfin, par des expériences de double hybride et de coprécipitation, il a été montré que les 81 derniers acides aminés en C-terminal de DDX6 sont indispensables au recrutement de DDX6 par RBP1 pour orchestrer la dégradation de l'ARNm POR1 (Chang and Lee, 2012b).

Un autre exemple intéressant a été montré chez la levure, dans lequel les protéines CTH1 et CTH2 coopèrent pour réguler le métabolisme du fer, en induisant la dégradation d'ARNm spécifiques en se liant à leurs séquences AREs (Pedro-Segura et al., 2008). Cette étude montre qu'en condition de privation de fer dans le milieu de culture, DDX6 facilite la dégradation de l'ARNm correspondant à la succinate déshydrogénase SDH4 *via* ses séquences AREs, en interagissant avec la protéine CTH2. Une hypothèse est que CTH2 pourrait recruter le complexe de décoiffage par son interaction avec DDX6, sur des ARNm portant des séquences AREs.

Enfin, la protéine Roquin est une protéine à doigt de zinc connue pour limiter l'expression de l'ARNm d'un costimulateur inductible (ICOS) en facilitant sa dégradation. La fonction de la protéine Roquin est donc, comme celle de PAT1B, entre répression et dégradation des ARNm.

Une étude montre qu'en complexe avec DDX6, Roquin déstabilise l'ARNm d'ICOS en interagissant en 3'UTR de cet ARNm dans les lymphocytes T (Yu et al., 2007). Les souris portant une mutation ponctuelle sur le gène *Rc3h1* codant pour la protéine Roquin développent une auto-immunité (Glasmacher et al., 2010). Dans les cellules humaines, des analyses d'immunofluorescence montrent la colocalisation des protéines Roquin, DDX6 et du facteur de décoiffage EDC4 (Glasmacher et al., 2010). Ces observations sont en accord avec l'hypothèse proposant que Roquin favorise l'inhibition de l'expression d'ICOS par ses interactions avec les protéines impliquées dans la répression et la dégradation des ARNm, DDX6 et EDC4 (Glasmacher et al., 2010).

5. L'ARN interférence

C'est en 1998 que le phénomène d'interférence par l'ARN a été décrit, chez *Caenorhabditis elegans*. Un ARN double-brin portant une séquence identique à celle d'un ARNm était capable d'induire une diminution de la quantité du transcrits ciblés et de générer un phénotype proche de celui d'un allèle nul chez les nématodes (Fire et al., 1998). Ce mode de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les petits ARN double-brin est conservé chez tous les organismes eucaryotes, excepté chez *Saccharomyces cerevisiae* (Aravind et al., 2000).

Chez les eucaryotes, 3 catégories de petits ARN ont été mis en évidence: les siARNs (*Small Interfering ARN*), les miARNs (*MicroARN*) et les piARNs (*ProInteracting ARN*). Les siARNs et les miARNs mesurent de 20 à 23 nucléotides. Les siARNs sont générés à partir de longs ARN double-brin et peuvent induire la dégradation de transcrits ayant des séquences parfaitement complémentaires, par coupure enzymatique. Les miARNs sont produits à partir d'ARN précurseurs comportant une tige-boucle et interagissent avec les ARNm qu'ils régulent *via* des séquences partiellement complémentaires. Les miARNs peuvent réprimer l'expression de leurs cibles sans pour autant altérer l'abondance des ARNm. La maturation des siARNs et miARNs est assurée par la protéine DICER. Les protéines de la famille Argonaute, AGO1, AGO2, AGO3 et AGO4 leur permettent d'assurer leurs fonctions

biologiques. Les piARNs, présents dans les lignées germinales, mesurent de 27 à 30 nucléotides. Leur activité est orchestrée par les protéines PIWI (*P-element Induced WImpy*), une sous famille de la famille Argonaute, identifiée dans le règne animal uniquement (Siomi et al., 2011).

DDX6 étant impliquée dans la voie des miARNs, la suite de cette introduction sera dédiée à cette voie de régulation. Si l'interférence par l'ARN sur des cibles parfaitement complémentaires (siARNs) est bien décrite de nos jours, le mécanisme exact de régulation par les miARNs reste encore à clarifier.

5.1. La voie de régulation des miARNs

Les miARNs régulent la traduction de plus de 60% des gènes codant pour des protéines en s'appariant à la région 3'UTR des ARNm de façon partiellement complémentaire (Esteller, 2011; Fabian and Sonenberg, 2012). Leur appariement au niveau de la région 3'UTR des ARNm entraîne la répression de la traduction des ARNm ciblés. Plus il y a de miARNs appariés dans cette région et plus la traduction de ces ARNm sera réprimée (Jackson and Standart, 2007).

5.1.1. Maturation des miARNs

Les miARNs sont issus de transcrits appelés miARN primaires (pri-miARN) transcrits dans le noyau par la polymérase II, et adoptant une conformation en tige-boucle dont la partie double brin n'est pas parfaitement complémentaire (Winter et al., 2009). La maturation des miARNs s'effectue en deux étapes orchestrées par les enzymes DROSHA et DICER (Filipowicz et al., 2008) (**Figure I11**).

Dans un premier temps, les pri-miARNs en conformation tige-boucle sont reconnus par un complexe « microprocesseur » (Liu et al., 2008). Les composants du cœur de ce microprocesseur sont DROSHA, une RNase de type III, accompagnée de la protéine DGCR8 liant les ARNs doubles brins (Liu et al., 2008). DGCR8 se lie à la jonction ARN double-brin / ARN simple-brin à la base de la tige boucle du pri-miARN, et recrute DROSHA qui clive la boucle, libérant ainsi un précurseur de miARN (pré-miARN) d'environ 70 nucléotides (Han et al., 2006). Même si les protéines DGCR8 et DROSHA sont suffisantes pour cliver la

boucle et libérer le pré-miARN *in vitro*, des expériences *in vivo* montrent que ce clivage nécessite la présence d'autres protéines faisant partie du microprocesseur (Fukuda et al., 2007; Guil and Cáceres, 2007).

Les pré-miARNs sont ensuite exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5 et son co-facteur Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, Ran-GTP est hydrolysé par la protéine RanGAP en Ran-GDP, permettant la dissociation de l'exportine 5 des pré-miARNs. Les pré-miARNs sont immédiatement pris en charge pour la protéine DICER dans le cytoplasme. La protéine DICER en complexe *via* son domaine PAZ avec la protéine TRBP (TAR RNA Binding Protein) assurent le clivage du pré-miARN en petits miARNs double brin de 21 paires de bases.

D'autres voies de biogenèse des miARNs ont été mises en évidence (J.-S. Yang & Lai 2011). Par exemple, le produit d'épissage d'un intron peut générer une structure en tige-boucle s'apparentant à un pré-miARN. Ces « mirtrons » ont été principalement caractérisés chez la Drosophile et chez *Caenorhabditis elegans*, même si certains ont été identifiés chez les mammifères (Sibley et al. 2012).

5.1.2. Assemblage du complexe miRISC et reconnaissance de l'ARNm cible

Les miARNs double brin ne possèdent pas d'activité catalytique. C'est pourquoi ils sont pris en charge par le complexe RISC composé d'une protéine Argonaute, AGO2, et de protéines associées. L'assemblage de ce complexe comprend deux étapes majeures : le chargement du petit ARN double brin au complexe RISC, et la dissociation du brin dit « passager » (**Figure I11**).

Chez les mammifères, un miARN double brin est chargé au sein de la protéine AGO2, formant le complexe pré-miRISC inactif, la forme double brin du miARN ne permettant pas l'interaction avec un ARNm cible. L'un des deux brins de miARNs, celui dont l'extrémité 5' se trouve à l'extrémité la moins thermodynamiquement stable est alors désigné comme le « brin guide » qui devient le miARN fonctionnel, tandis que l'autre brin, le brin « passager », est éjecté de la protéine AGO puis dégradé (Esteller, 2011; Filipowicz et al., 2008; Meijer et al., 2014). Cette étape marque le passage du complexe miRISC d'un état

inactif à un état actif dans lequel le « miARN guide » associé à AGO peut s'apparier à l'ARNm cible.

Deux modes de reconnaissance de la séquence cible portée par un ARNm ont été décrits (Rana, 2007). D'une part, le complexe RISC peut « scanner » les molécules d'ARNm à la recherche d'une séquence complémentaire ou bien, le complexe RISC peut interagir de façon aléatoire avec des molécules d'ARNm jusqu'à trouver une séquence complémentaire.

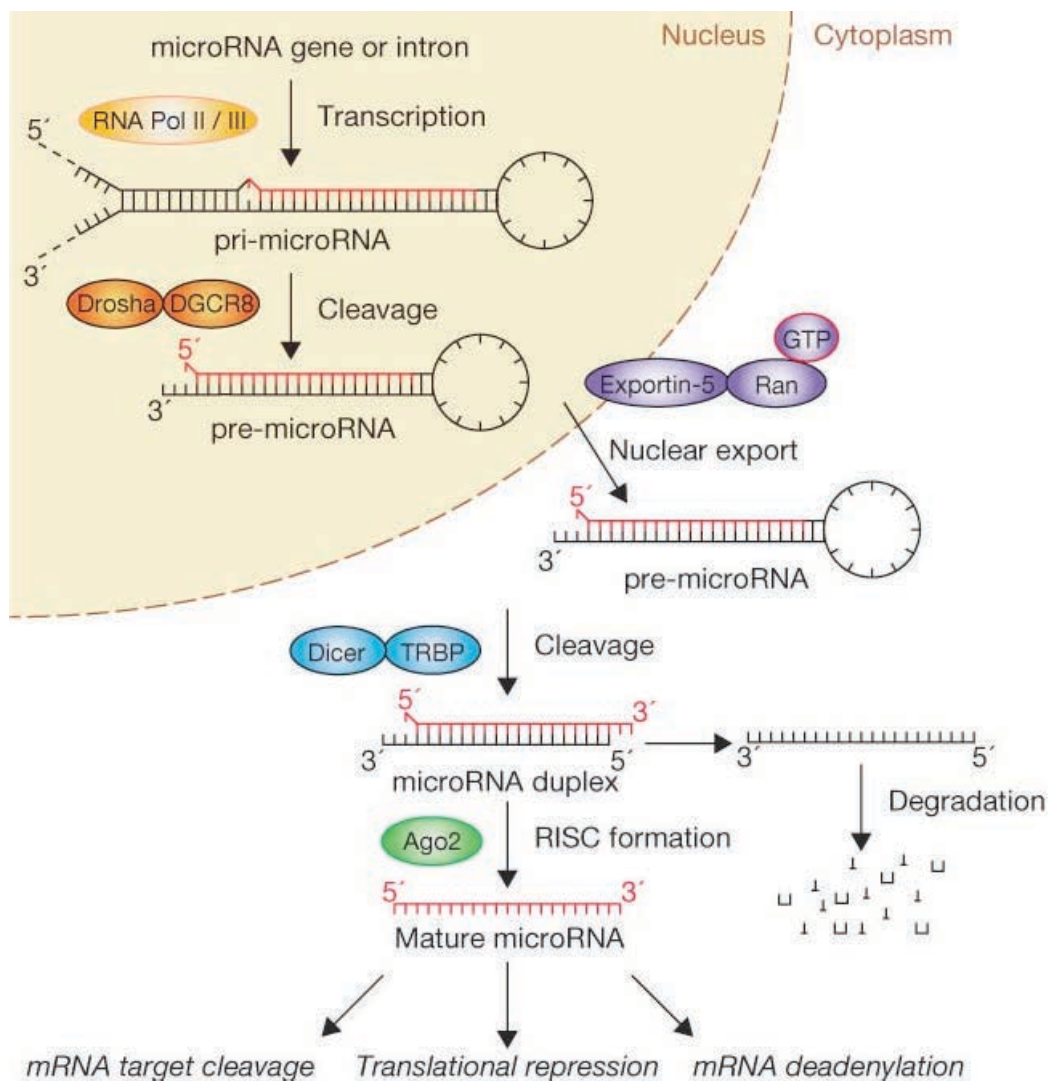


Figure I 11 : La voie de biogenèse et de maturation des microARNs

5.1.3. Régulation de la traduction des ARNm par les miARNs

L'interaction entre le complexe miRISC et un ARNm cible entraîne l'inhibition de son expression. Cette inhibition peut s'expliquer de différentes façons. Dans de très rares cas, l'ARNm ciblé est clivé par AGO2. Plus classiquement, l'ARNm est réprimé ou dégradé.

Les premières études sur la répression de la traduction par les miARNs proposaient que cette voie de répression intervienne après l'initiation de la traduction. Chez *C. elegans*, le miARN lin-4 réprime la traduction des ARNm lin-14 et lin-28, sans influencer leur abondance. De plus, même si l'expression des protéines lin-14 et lin-28 était inhibée, les ARNm correspondant étaient détectés dans les polysomes, suggérant que la répression orchestrée par ces miARNs avait lieu après l'initiation de la traduction (Olsen and Ambros, 1999).

Des études plus récentes proposent que la répression par les miARNs ait lieu pendant l'initiation de la traduction. En effet, il a été observé que les miARNs n'assuraient leur fonction de répression de la traduction que si les ARNm portaient une coiffe fonctionnelle. De plus, chez la souris et l'Homme, les miARNs ne répriment pas les ARNm dont la traduction s'effectue *via* les séquences IRES (Mathonnet et al., 2007). De plus en plus d'études montrent que la machinerie de répression de la traduction par les miARNs interfère avec la coiffe ou avec le complexe eIF4F (Huntzinger and Izaurralde, 2011). De nombreux arguments suggèrent que si la voie des miARNs induit la répression de la traduction, cette répression se produit pendant l'initiation de la traduction.

Certaines observations montrent que les miARNs peuvent également induire la dégradation des ARNm qu'ils régulent. En effet, une analyse de transcriptome à partir de cellules de mammifère montre qu'en présence d'un miARN particulier, l'abondance du transcrit portant la séquence complémentaire diminue (Selbach et al., 2008). De plus, lorsque les composants essentiels de la voie des miARNs sont déplétés (DICER, AGOs ou GW182 dont nous parlerons dans le paragraphe suivant), l'abondance des transcrits régulés par des miARNs augmente (Eulalio et al., 2008). Si les miARNs peuvent orchestrer le clivage endonucléolytique d'un transcrit parfaitement complémentaire en terme de séquence, cela est rare puisque la majorité des transcrits sont partiellement complémentaires à la séquence des miARNs. Dans la majorité des cas, les miARNs dirigent les ARNm ciblés vers la machinerie

de dégradation 5'-3' où ils sont dégradés.

Les protéines de la famille GW182 (TNRC6A (GW182), B et C chez les mammifères, AIN1 et AIN2 chez *C. elegans*) interagissent avec les protéines AGO, et l'inhibition de cette interaction empêche la répression induite par les miARNs, mettant en évidence l'importance de cette interaction dans la régulation des ARNm par les miARNs (Behm-Ansmant, 2006). GW182 interagit également avec la PABPC. Plusieurs observations suggèrent que cette interaction est importante pour l'interférence par l'ARN : D'une part, la surexpression de la PABPC chez l'Homme et la drosophile inhibe l'activité d'interférence ARN. D'autre part, la déplétion de la protéine PABPC empêche la déadénylation orchestrée par la voie des miARNs (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

Pour résumer les dernières données publiées sur le sujet, un modèle est proposé, dans lequel le point de départ est la reconnaissance de l'ARNm ciblé par un miARN en complexe avec une protéine AGO. AGO interagit alors avec GW182 qui à son tour interagit avec la protéine PABPC au niveau de la queue poly(A). L'assemblage de ce complexe sur l'ARNm entraîne sa déadénylation, le mécanisme sous-jacent restant à déterminer. L'ARNm peut alors être stocké sous forme réprimée, ou décoiffé et rapidement dégradé par l'exonucléase XRN1 (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

5.2. Implication de DDX6 dans l'ARN interférence

Dans les cellules HeLa, des expériences de FRET indiquent que DDX6 interagit avec AGO1 et AGO2 *in vivo* (Chu and Rana, 2006). De plus, DDX6 est recrutée dans des complexes RISC (siRISC ou miRISC) fonctionnels (Chu and Rana, 2006).

Néanmoins, la déplétion de DDX6 dans les cellules HeLa n'affecte pas de façon significative l'activité d'ARN interférence assurée par les siARN, suggérant que DDX6 n'est pas nécessaire dans la voie des siARNs (Chu and Rana, 2006). En revanche, la déplétion de DDX6 lève la répression de la traduction des ARNm régulés par les miARNs, suggérant un rôle important de DDX6 dans la voie des miARNs. Enfin, le niveau d'expression de la protéine RAS, connue pour être régulée par le miARN let-7 (Johnson et al., 2005), a été suivi en présence et en absence de DDX6 dans les cellules humaines. Le niveau d'expression de RAS augmente dans les cellules déplétées pour DDX6, en comparaison avec les cellules non

traitées. Cela confirme que DDX6 est impliquée dans la voie des miARNs, et qu'elle peut être recrutée par miRISC pour assurer son rôle de répresseur (Chu and Rana, 2006). Chez *C.elegans*, l'interaction entre DDX6 et AGO1 et AGO2 est conservée, et DDX6 interagit également avec GW182 et avec NHL-2 (un co-facteur du complexe miRISC) (Hammell et al., 2009).

Enfin, dans les cellules HeLa déplétées pour DDX6, un test de complémentation fonctionnelle montre que la protéine DDX6 mutée sur son site d'interaction avec CNOT1 est inactive dans l'interférence par les miARNs (Rouya et al., 2014). D'autres études récentes mettent également en évidence l'importance de l'interaction directe entre DDX6 et la sous-unité CNOT1 du complexe CCR4-NOT (voir partie 4.5.1) dans l'interférence par les miARNs (Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014a)



Figure I 12 : Schéma du complexe RISC

6. Les P-bodies

Il existe une large variété de granules composés de mRNPs. La classification des granules est basée sur les types cellulaires dans lesquels ils sont observés, leur localisation subcellulaire, leur fonction présumée, et leur composition en protéines. Pour citer quelques exemples de granules mRNPs cytoplasmiques, les granules germinaux sont des granules impliqués dans le stockage et la localisation des ARNm dans les cellules germinales, tandis que les granules de transport transitent le long des microtubules dans les axones et les dendrites des neurones leur rôle étant d'assurer la localisation des ARNm. Les granules de stress ne s'assemblent qu'en conditions de stress cellulaire et contiennent un grand nombre de facteurs d'initiation de la traduction (Anderson and Kedersha, 2008). Enfin, les P-bodies (*Processing-bodies*) sont caractérisés par leur enrichissement en protéines impliquées dans la dégradation et la répression des ARNm, et en facteurs impliqués dans l'interférence ARN.

Comme nous le verrons, une fraction de DDX6 se concentre dans les P-bodies, et cette protéine est nécessaire à leur assemblage. C'est pourquoi nous nous intéresserons particulièrement aux P-bodies dans la suite de cette introduction.

6.1. La découverte des P-bodies

La première observation de ces granules a lieu en 1997 dans des fibroblastes de souris, au sein desquels l'exonucléase XRN1 est enrichie dans des foci appelés « foci cytoplasmiques XRN1 ». (Bashkirov et al., 1997). Plus tard, la même structure a été observée à partir d'un sérum de patiente atteinte d'une neuropathie. La protéine GW182 est alors localisée dans des « speckles » cytoplasmiques baptisés GW bodies (GWB) (Eystathiou et al., 2002). Les P-bodies sont par la suite observés dans divers organismes, conservés chez tous les eucaryotes, de la levure à l'homme (Chan and Fritzler, 2013).

Différents facteurs impliqués dans la répression et la dégradation des ARNm se localisent en fait dans des foci cytoplasmiques baptisés « Processing bodies », P-bodies, pour leur possible implication dans le métabolisme des ARNm. De nos jours, de nombreux facteurs impliqués dans la dégradation et la répression des ARNm ont été observés dans ces granules, ainsi que les protéines de l'ARN interférence. Nous parlerons de la composition des P-bodies dans la partie 6.3.

6.2. Structure des P-bodies

Deux études ont permis d'observer la structure des P-bodies dans des cellules HeLa par immunoelectromicroscopie, avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine DDX6 ou la protéine GW182, et un anticorps secondaire couplé à des grains d'or de 10 nm (**Figure I13**). Ce sont des granules cytoplasmiques dépourvus de membrane, de structure dense et fibrillaire, et d'environ 300-500 nm de diamètre (Souquere et al., 2009; Zheng Yang et al., 2004).

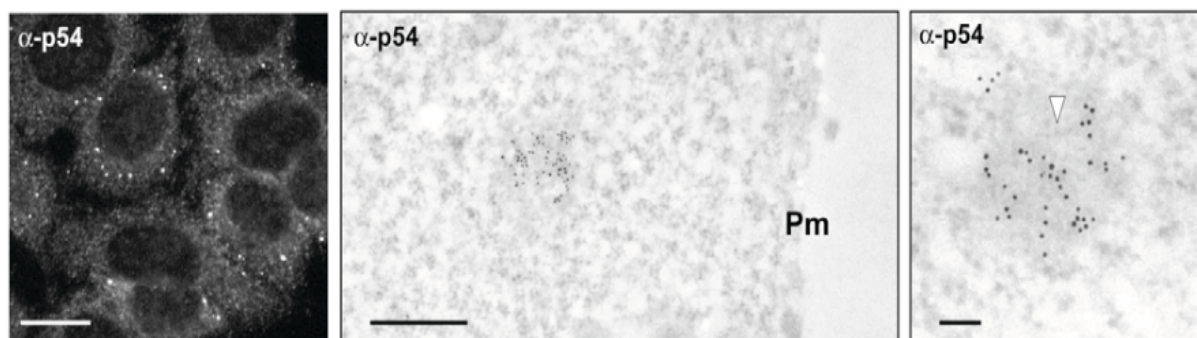


Figure I 13 : Ultra-structure des P-bodies (Souquere et al., 2009)

Panneau de gauche : Immunofluorescence sur cellules HeLa avec l'anticorps dirigé contre la protéine DDX6 endogène (barre d'échelle 10 µm).

Panneaux du milieu et de droite : immuno-microscopie électronique avec un anticorps dirigé contre la protéine endogène DDX6, et un anticorps secondaire couplé à des grains d'or (Echelles : 500 et 100 nm). Pm : membrane plasmique.

Les P-bodies peuvent varier en taille et en nombre durant le cycle cellulaire. En culture asynchrone, certaines cellules présentent des P-bodies plus ou moins grands. Les P-bodies ont pu être observés au cours des différentes phases du cycle cellulaire. En effet, un anticorps dirigé contre une protéine s'exprimant plus ou moins selon les différentes phases du cycle cellulaire, CENP-F (*CEN*tromere *P*rotein type *F*) a été utilisé. La protéine CENP-F est absente en phase G1, en faible quantité et au niveau nucléaire en phase S, elle s'accumule près de l'enveloppe nucléaire en phase G2, et se localise entre kinétochores, fuseau mitotique, sillon de division et pont intercellulaire en phase mitotique (Z. Yang et al., 2004). Cette analyse montre que les P-bodies sont de petite taille voire absents des cellules en phase G1 et S précoce, ce qui n'est pas le cas dans les cellules HEK293 et HeLa que nous utilisons au laboratoire, dans lesquelles les P-bodies sont assemblés en interphase. Il observe également que les P-bodies sont assemblés en phases S et G2, et absents en phase M (mitose) (Yang et al., 2004). En se focalisant sur la phase mitotique, Yang et al., observent que les P-bodies se dissocient avant l'entrée en mitose pour se réassembler en phase G1. Les P-bodies peuvent également varier en nombre, selon l'organisme ou les conditions cellulaires (Teixeira et al., 2005). Par exemple chez la levure, les P-bodies ne s'assemblent que dans des conditions particulières, comme par exemple en cas de privation de glucose dans le milieu de culture.

6.3. Composition des P-bodies

6.3.1. Protéines localisées dans les P-bodies

Les protéines présentes dans le tableau ci-après ont été observées dans les P-bodies (**Figure I14**). Un certain nombre de protéines localisées dans les P-bodies ne sont pas des constituants stables de ces derniers, et font des allers retours entre ces granules et le cytoplasme. Pour observer la dynamique des protéines GFP-GW182, YFP-DCP1A et GFP-DCP2 entre P-bodies et cytoplasme, des analyses par technique de FRAP (***F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hoto**b**leaching) ont été réalisées dans des cellules humaines (Aizer et al., 2008; Kedersha et al., 2005). La dynamique de la protéine DCP1A est variable : l'échange est rapide dans les petits P-bodies, et plus lent dans les P-bodies plus grands. L'échange de la protéine GW182 est très lent (Kedersha et al., 2005). Au contraire, l'enzyme de décoiffage DCP2 est un composant stable des P-bodies, dont une partie semble y être localisée de façon permanente (Aizer et al., 2008).*

Protéines	Fonction	Organisme	Référence(s)
DDX6	Dégradation, répression des ARNm et ARN interférence	Mammifères, levure, <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila</i>	(Barbee et al., 2006; Gallo et al., 2008; Sheth and Parker, 2003a; Wilczynska et al., 2005)
PAN2/PAN3	Déadénylation	Mammifères	(Zheng et al., 2008)
CCR4, CAF1, CNOT7	Déadénylation	Mammifères et levure	(Andrei et al., 2005; Cougot et al., 2004; Sheth and Parker, 2003a; Zheng et al., 2008)
DCP1	Décoiffage	Mammifères, levure, <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila</i>	(Gallo et al., 2008; Ingelfinger et al., 2002; Sheth and Parker, 2003a; Tritschler et al., 2007; van Dijk et al., 2002; Wilczynska et al., 2005)
DCP2	Enzyme de décoiffage	Mammifères, levure, <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila</i>	(Gallo et al., 2008; Ingelfinger et al., 2002; Sheth and Parker, 2003a; Tritschler et al., 2007; van Dijk et al., 2002; Wilczynska et al., 2005)
EDC3	Activateur de décoiffage	Mammifères, levure, <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila</i>	(Fenger-Grøn et al., 2005; Kshirsagar and Parker, 2003; Tritschler et al., 2007)
EDC4	Activateur de décoiffage	Mammifères et <i>Drosophila</i>	(Behm-Ansmant, 2006; Fenger-Grøn et al., 2005; Yu et al., 2005)
LSM1-7	Activateur du décoiffage	Mammifères, levure, <i>C.elegans</i>	(Gallo et al., 2008; Ingelfinger et al., 2002; Kedersha et al., 2005; Sheth and Parker, 2003a; Stoecklin et al., 2006)
XRN1	Exonucléase 5'-3'	Mammifères et levure	(Kedersha et al., 2005; Sheth and Parker, 2003)
PAT1	Activateur du décoiffage et répresseur de la traduction	Mammifères	(Eulalio et al., 2007)
CPEB1	Répresseur de la traduction	Mammifères	(Wilczynska et al., 2005)
LSM14A	Répresseur de la traduction	Mammifères, levure, <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila</i>	(Barbee et al., 2006; Gallo et al., 2008; Sheth and Parker, 2003a; Wilczynska et al., 2005)
eIF4E-T	Répresseur de la traduction	Mammifères	(Andrei et al., 2005; Ferraiuolo et al., 2005)
eIF4E	Facteur d'initiation de la traduction	Mammifères et levure	(Andrei et al., 2005; Ferraiuolo et al., 2005; Hoyle et al., 2007)
eIF4G	Facteurs d'initiation de la traduction	Levure	(Hoyle et al., 2007)
eRF1	Facteur de terminaison de la traduction	Levure	(Buchan et al., 2008)
eRF3	Facteur de terminaison de la traduction	Levure	(Buchan et al., 2008)
PAB1	Protéine de liaison à la queue poly(A)	<i>C.elegans</i>	(Hoyle et al., 2007)
Roquin	Stabilité des ARNm	Mammifères	(Yu et al., 2007)
UPF1, UPF2, UPF3, SMG5, SMG6 et SMG7	NMD	Mammifères	(Durand et al., 2007; Unterholzner and Izaurralde, 2004)
TTP, BRF1, BRF2	Dégradation <i>via</i> les AREs	Mammifères	(Franks and Lykke-Andersen, 2007; Stoecklin and Anderson, 2007)
GW182	microARN	Mammifères, <i>C.elegans</i> , <i>Drosophila</i>	(Behm-Ansmant, 2006; Ding et al., 2005; Eystathiou, 2003)
AGO1	microARN	Mammifères	(Liu et al., 2005)
AGO2	microARN	Mammifères	(Leung et al., 2006; Sen and Blau, 2005)
MLN51	NMD	Mammifères	(Cougot et al., 2014)

Figure I 14 : Protéines localisées dans les P-bodies

Seule les protéines d'intérêt pour mon projet de thèse sont répertoriées dans ce tableau

6.3.2. Importance de la présence d'ARNm réprimée

Les études portant sur les P-bodies et les granules de stress ont montré qu'ils partagent des points communs dans leur mode d'assemblage (Buchan, 2014).

En effet, les ARNm non traduits sont des composants essentiels à l'assemblage de ces granules puisqu'ils ne peuvent pas s'assembler en présence de cycloheximide ou d'émétine qui sont des drogues qui figent les ARNm sous forme polysomiale (Kedersha et al., 2000; Sheth and Parker, 2003b). Des études montrent également qu'augmenter le stock d'ARNm réprimés en inhibant l'initiation de la traduction ou la dégradation des ARNm stimule l'assemblage des granules de stress et des P-bodies. En effet, chez les levures dans lesquelles des mutations sont introduites sur les gènes codant pour le facteur de décoiffage DCP1 ou pour l'exonucléase 5'-3' XRN1, il y a une augmentation des P-bodies en taille et en nombre (Sheth and Parker, 2003). Un autre exemple repose sur des levures portant un allèle thermosensible (prt-63) sur le gène codant pour le facteur d'initiation de la traduction PRT1P (une sous-unité du complexe d'initiation eIF3). Dans les souches contenant cet allèle, la traduction est inhibée à 37°C (Evans et al., 1995). En incubant les levures à 37°C pendant 20 minutes, la taille des P-bodies augmente, suggérant que le taux de traduction peut influencer l'assemblage des P-bodies (Teixeira et al., 2005).

6.4. Importance de DDX6 dans l'assemblage des P-bodies

L'assemblage des P-bodies peut être influencé par le niveau d'expression de certaines protéines de régulation de la traduction pouvant être localisées dans ces granules. Lorsque la protéine CPEB1 est surexprimée, il y a induction de l'assemblage des granules de stress et disparition des P-bodies (Wilczynska et al., 2005). De plus, lorsque l'expression de ces protéines est inhibée par ARN interférence, le nombre de P-bodies peut être réduit voir nul dans les cellules de mammifères. Ces observations ont été faites pour GW182 (Z. Yang et al., 2004), LSM1, DDX6, 4E-T et CCR4 (Andrei et al., 2005), EDC4 (Yu et al., 2005), LSM14A (Yang et al., 2006), CPEB1 (Wilczynska et al., 2005) et PAT1b (Marnef et al., 2010; Ozgur et al., 2010). Ces données suggèrent que toutes ces protéines sont nécessaires à l'assemblage des P-bodies.

De façon intéressante, notre équipe a montré qu'un traitement à l'arsenite des cellules déplétées pour les protéines GW182 et CPEB1 permettait le réassemblage des P-bodies en 30 minutes, suggérant que leur assemblage n'est pas empêché par l'absence de protéines GW182 et CPEB1 (Serman et al., 2007). Par contre l'incubation des cellules déplétées pour DDX6 avec l'arsenite n'induit pas le réassemblage des P-bodies (**Figure I15**). Cela montre que DDX6 est indispensable à l'assemblage des P-bodies dans ces conditions.

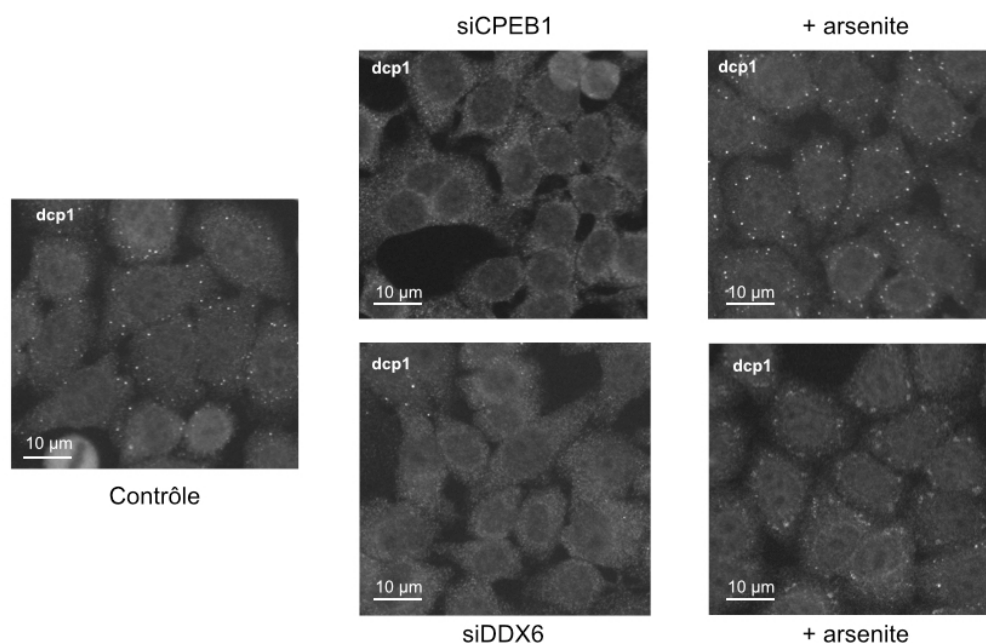


Figure I 15 : Influence des protéines CPEB1 et DDX6 sur l'assemblage des P-bodies (Serman et al., 2007)

Cellules HeLa déplétées pour DDX6 ou CPEB1, observées avant et après traitement à l'arsenite et marquées avec l'anticorps dirigé contre la protéine DCP1. Panneau en bas à droite : DCP1 se relocalise dans les granules de stress.

6.5. Fonctions présumées des P-bodies

La composition en protéines des P-bodies est éloquentes concernant le rôle de ces granules dans le métabolisme de l'ARNm, entre stockage, répression et stabilité des ARNm (**Figure I12**).

Certaines études montrent le rôle des P-bodies dans le stockage d'ARNm réprimés. Lorsque les ARNm sont bloqués sous forme polysomiale par traitement à la cycloheximide,

les P-bodies sont dissociés (Wilczynska et al., 2005). Une étude montre que lorsque la traduction est inhibée en cultivant les levures dans un milieu dépourvu de glucose, les ARNm s'accumulent dans les P-bodies. Lorsque le glucose est à nouveau disponible dans le milieu de culture, les ARNm se relocalisent dans le cytoplasme pour y être à nouveau traduits (Bregues et al., 2005). Il a également été montré que les P-bodies sont des sites de stockage d'ARNm dont l'expression est inhibée par des miARNs. C'est le cas de l'ARNm CAT-1 (*Cationic Amino acid Transporter 1*) qui se concentre dans les P-bodies lorsqu'il est réprimé par miR-122 dans des hépatocytes humaines (Bhattacharyya et al., 2006; Teixeira et al., 2005). Ces granules seraient donc des sites de stockage des ARNm réprimés.

D'autres études suggèrent que les P-bodies sont des sites de dégradation des ARNm. Dans les cellules humaines, lorsque les ARNm sont dissociés des polysomes par traitement à la puromycine, le nombre de P-bodies augmente. Chez des levures portant des mutations sur les gènes codant pour l'exonucléase XRN1 ou pour le facteur de décoiffage DCP1, les ARNm non dégradés s'accumulent massivement dans les P-bodies (Sheth and Parker, 2003b). D'autres études montrent que réduire le taux de dégradation 5'-3' des ARNm en inhibant l'expression d'XRN1 par ARN interférence entraîne une augmentation du nombre de P-bodies (Cougot et al., 2004). Ces observations suggèrent donc un rôle important des P-bodies dans la dégradation des ARNm.

Enfin, les P-bodies contiennent les protéines du complexe RISC et des petits ARN non codants, suggérant un rôle de ces granules dans les voies de l'interférence ARN. Plusieurs études se sont intéressées à savoir dans quelle voie d'interférence les P-bodies étaient impliqués (siARN ou miARN ?), et si l'activité d'interférence dépendait de la présence de P-bodies dans les cellules humaines.

Certains travaux montrent que la déplétion de GW182 par ARN interférence entraîne une diminution du nombre de P-bodies et inhibe partiellement l'activité d'interférence de la voie des miARNs et des siARNs (Jakymiw et al., 2005). D'autres montrent que la déplétion de GW182 mène à une nette inhibition de la voie des miARNs et à une infime diminution de l'activité d'interférence assurée par les siARNs (Liu et al., 2008; Rehwinkel, 2005). Enfin, notre équipe a montré que l'efficacité des siARNs et leur effet sur le nombre de P-bodies ne sont pas corrélés. D'autre part, l'efficacité de répression des ARNm par l'ARN interférence est indépendante de la présence de P-bodies (Serman et al., 2007). La même question a été

posée chez la drosophile. Pour dissocier les P-bodies, les protéines LSM1, LSM3, PAT1B ou EDC4 ont été déplétées. Lorsque GW182 est associée artificiellement à un ARNm rapporteur dans les cellules dépourvues de P-bodies, une forte réduction de l'expression de la luciférase due à une baisse du niveau d'ARNm est observée, suggérant à nouveau que l'activité d'interférence par les ARN est indépendante de la présence de P-bodies (Eulalio et al., 2007).

Si toutes ces études proposent que les P-bodies soient impliqués dans la répression et le stockage ainsi que dans l'ARN interférence et la dégradation des ARNm, il ne sont pas pour autant indispensables à ces fonctions comme le montre une étude chez la levure, au sein desquelles ni la dégradation ni le stockage des ARNm ne semblent perturbés en l'absence de P-bodies (Balagopal and Parker, 2009). Les fonctions précises de ces granules, et la raison pour laquelle ils sont conservés chez les eucaryotes reste encore à élucider.

6.6. Les granules de stress en quelques mots

Notre équipe a également observé l'ultrastructure des granules de stress. Des images des granules de stress en electromicroscopie ont été réalisées dans des cellules HeLa. Les granules de stress sont dépourvus de membrane, mesurent 1 à 2 micromètres et ont une structure fibrillogranulaire (**Figure I16**) (Souquere et al., 2009).

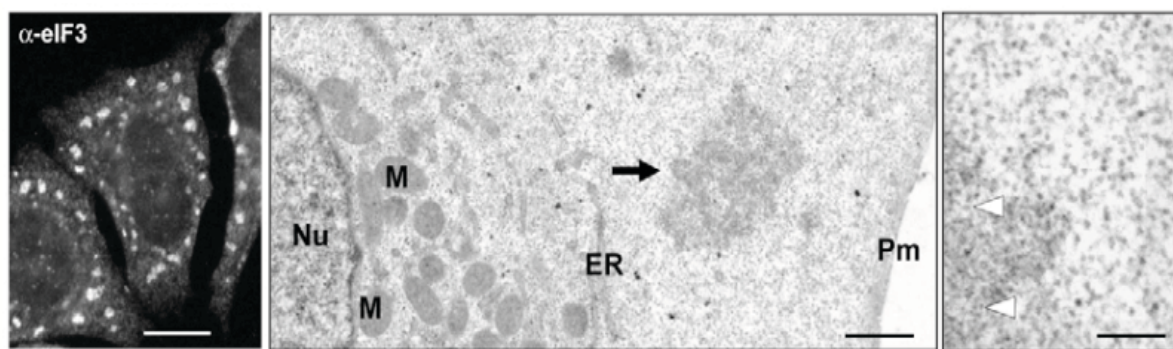


Figure I 16 : Ultra-structure des granules de stress (Souquere et al., 2009)

Panneau de gauche : Immunofluorescence sur cellules HeLa traitées à l'arsenite, avec l'anticorps dirigé contre la protéine eIF3 endogène (Echelle 10 μm).

Panneaux du milieu et de droite : microscopie électronique sur cellules HeLa traitées à l'arsenite (Echelles : 1 μm et 200 nm). La flèche noire indique le granule de stress. M : mitochondrie, Pm : membrane plasmique, Nu : noyau, ER : réticulum endoplasmique

En termes de composition, les granules de stress contiennent des ARNm, des protéines de la sous-unité 40S du ribosome, l'ARNr 18S, des facteurs d'initiation de la traduction comme eIF3 et eIF4F, et des répresseurs de la traduction comme TIA1, TIAR, FMRP, LSM14A et CPEB1 (Kedersha et al., 2002; Mazroui et al., 2002; Souquere et al., 2009; Wilczynska et al., 2005; Yang et al., 2006).

Les granules de stress se forment en réponse à différentes conditions de stress entraînant l'arrêt de la traduction, et notamment à la suite de la phosphorylation du facteur eIF2 (Anderson and Kedersha, 2006). Comme nous l'avons vu en début d'introduction, ce facteur est impliqué dans le complexe ternaire eIF2/tRNA_i^{Met}/GTP d'initiation de la traduction. Il s'assemble à la sous-unité 40S du ribosome et à différents facteurs d'initiation pour former le complexe de préinitiation 48S au niveau du codon d'initiation de la traduction. Lorsque eIF2 est phosphorylé, le complexe ternaire est partiellement inactif menant à une inhibition de l'initiation de la traduction (Jackson et al., 2010b).

La phosphorylation massive du facteur d'initiation eIF2 mène à l'assemblage des granules de stress. Les sous-unités 40S déjà engagées dans l'initiation de la traduction d'ARNm sont associées à des complexes appelés 48S*, dans lesquels certains facteurs d'initiation comme eIF2 et eIF5 sont absents (Kedersha et al., 2002). Ces complexes 48S* associés à des RBPs constituent le cœur des granules de stress. Parmi ces RBPs sont présentes les protéines TIA1 (*T-cell Internal Antigen 1*) et G3BP1 (*Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-Binding-Protein 1*) qui contiennent des domaines d'agrégation. Par exemple, la protéine TIA1 porte un domaine riche en glutamine en C-terminal s'apparentant à un domaine prion. Ce domaine est nommé PRD (*Prion-Related Domain*). Il est indispensable à l'assemblage des granules de stress dans les cellules de mammifères (Gilks et al., 2004). Dans les cellules de mammifères, la surexpression de G3BP1 ou de TIA1 est suffisante pour induire la formation de granules de stress, en l'absence de tout autre stress. Au contraire, l'extinction de l'expression des gènes codants pour G3BP1 et TIA1 inhibe l'assemblage des granules de stress (Gilks et al., 2004; Kedersha et al., 2000; Tourriere et al., 2003).

Une étude récente s'appuie sur la protéine du cœur du complexe de jonction d'exon, MLN51 (*Metastatic Lymph Node 51*) qui est impliquée dans l'activation de la traduction, interagissant avec des polysomes actifs (Chazal et al., 2013). Cette protéine, principalement cytoplasmique, est impliquée dans l'assemblage des P-bodies. MLN51 est un composant des

P-bodies qui s'accumule dans les granules de stress et dans un nouveau type de granules appelés SMIGs (*Small MLN51-Induced Granules*) lorsqu'elle est surexprimée. De façon intéressante, sa surexpression entraîne également la dissociation des P-bodies dans les cellules HeLa (Cougot et al., 2014).

6.7. Dynamique d'assemblage des granules

6.7.1. Rôle des domaines d'interaction

Un autre mécanisme d'assemblage repose sur les domaines d'interaction portés par certaines protéines. Prenons l'exemple des P-granules chez *Caenorhabditis elegans*. Lorsque les protéines des P-granules GFP-PGL-1 et GFP-PGL-3 sont exprimées dans les cellules somatiques du ver (en absence de facteurs spécifiques des P-granules présents dans les cellules germinales), elles forment des granules de façon autonome (Hanazawa et al., 2011). L'étude s'est intéressée à plusieurs motifs de liaison à l'ARNm présents en C-terminal de ces protéines :

- Une RGG box riche en arginine et en glycine. Lorsque ce domaine est muté dans la protéine PGL-3, les granules se forment, mais n'accumulent aucun facteur normalement présent dans les P-granules. Le motif RGG est donc essentiel à l'accumulation des protéines dans ces granules (Hanazawa et al., 2011).
- Un domaine de 159 acides aminés sur la protéine PGL-3. Ce domaine permet l'interaction de PGL-3 sur elle-même et avec PGL-1 *in vitro* (Kawasaki et al., 2004). Lorsqu'il est délété dans la protéine PGL-3(Δ 160-139), aucun P-granule n'est observé chez les vers . Ce domaine d'auto-interaction est donc indispensable à l'assemblage des P-granules chez *C.elegans* (Hanazawa et al., 2011).

Chez la levure, les domaines LSm et Yjef-N de la protéine EDC3 sont nécessaires à l'assemblage des P-bodies en liant plusieurs protéines au sein de ces granules pour former un agrégat (Decker et al., 2007). De même chez la drosophile le domaine d'interaction protéine-protéine en N-terminal de FMRP (« *Fragile X Mental Retardation Protein* ») induit la formation de « granules FMRP » (Gareau et al., 2013).

D'autres observations montrent que des domaines « prion-like » sont impliqués dans la localisation de protéines dans des granules, ainsi que dans l'assemblage de ces granules. C'est le cas de la protéine TIA1 qui s'agrège avec elle-même *via* son domaine prion, et facilite ainsi l'assemblage des granules de stress (Buchan et al., 2008; Gilks et al., 2004; Kedersha et al., 1999). Chez la levure, la protéine LSM4 présente également un domaine prion nécessaire à l'assemblage des P-bodies (Decker et al., 2007; Reijns et al., 2008). Enfin, une étude chez la levure montre que le domaine prion de la protéine CCR4, et de façon moindre les domaines prion des protéines DDX6 et POP2 contribuent à leur accumulation dans les P-bodies en condition de stress (Reijns et al., 2008).

En revanche, les résultats observés dans les cellules HeLa ne mènent pas aux mêmes conclusions. En effet, notre équipe a montré par des expériences de complémentation fonctionnelle, que la protéine DDX6 délétée du domaine « prion-like » (GQ) induisait l'assemblage des P-bodies avec la même efficacité que la protéine DDX6 entière (Ernoul-Lange et al., 2012). Le domaine prion de DDX6 n'est donc pas nécessaire à l'assemblage des P-bodies dans les cellules HeLa (Ernoul-Lange et al., 2012).

Pour tester l'importance des protéines motrices associées au cytosquelette dans l'assemblage des granules de stress, les cellules HeLa ont été traitées à l'arsenite, puis au vanadate ou à l'EHNA (*E*rythro-9-(2-*H*ydroxy-3-*N*onyl)*A*denine) qui sont des inhibiteurs de l'activité ATPase de la dynéine HDAC6. La dynéine HDAC6 est une protéine motrice associées aux microtubules du cytoplasme et qui permet le déplacement rétrograde d'organites, c'est à dire vers le centre de la cellule. Dans les deux cas, le réseau de microtubule est intact, mais les granules de stress ne s'assemblent pas, mettant en évidence l'importance de la dynéine HDAC6 dans l'assemblage de ces granules (Kwon et al., 2007).

6.7.2. Rôle du cytosquelette et des protéines motrices associées dans la mobilité des granules

Le cytosquelette ainsi que les protéines motrices associées contribuent à la mobilité des P-bodies. En suivant en direct par vidéo-microscopie, le mouvement des P-bodies grâce à des protéines étiquetées, DCP1A-GFP, DCP1B-GFP et DCP2-GFP, une étude s'est intéressée au transport des P-bodies au sein de cellules de mammifères. Les P-bodies ont été observés sur différents lapses de temps, de quelques secondes à quelques heures. Même s'ils sont

dynamiques, la plupart des P-bodies restent confinés dans certaines régions du cytoplasme (Aizer et al., 2008). Certains P-bodies ont des mouvements dirigés, suggérant qu'ils sont associés au cytosquelette. Grâce à des plasmides GFP-actine ou GFP-alpha-tubuline il a été montré que les P-bodies stationnaires sont associés aux câbles d'actine, et les P-bodies présentant des mouvements confinés sont associés aux microtubules, leurs petits mouvements étant en fait dus aux balancements des microtubules dans le cytoplasme (Aizer et al., 2008). Enfin, les traitements à la vinblastine ou au nocodazole qui déstabilisent le réseau de microtubules entraînent une diminution de la mobilité des P-bodies (Aizer et al., 2008).

Observée dans les P-bodies, l'isoforme p50^{Nespl} de la nesprin agit comme une protéine motrice associée aux microtubules, et assure la liaison entre P-bodies et microtubules *via* son interaction avec les protéines des P-bodies, DDX6, AGO2 et DCP1A (Rajgor et al., 2014). Une autre étude montre que la myosine Va est nécessaire à la mobilité des P-bodies dans les cellules humaines, et la surexpression du dominant négatif de la myosine Va inhibe la mobilité des P-bodies (Lindsay and McCaffrey, 2011). Enfin, la dynéine DHC1 et les kinésines KIF5B et KLC sont également impliquées dans le mouvement des P-bodies et des granules de stress (Loschi et al., 2009).

6.8. Trafic des protéines entre granules

Dans certains cas, les protéines des P-bodies peuvent se relocaliser dans les granules de stress (Kedersha et al., 2005; Wilczynska et al., 2005).

Les granules de stress peuvent être induits par la surexpression de certaines protéines. C'est le cas de la protéine CPEB1 pourtant présente dans les P-bodies, et dont la surexpression entraîne l'assemblage des granules de stress. Dans 70% des cellules transfectées avec un plasmide codant pour la protéine GFP-CPEB1 délétée en son domaine RRM, les P-bodies disparaissent et la protéine DCP1 normalement présente dans les P-bodies, est relocalisée dans les granules de stress. La même observation est faite pour les protéines GW182, XRN1, FAST (*Fas-activated serine/threonine phosphoprotein*) et eIF4E (Kedersha et al., 2005; Wilczynska et al., 2005).

Une étude plus récente de vidéo microscopie et de microscopie électronique dans les cellules humaines menées par notre équipe montre que les granules de stress se forment à

proximité de P-bodies préexistants, mais aussi dans l'ensemble du cytoplasme, même dans des régions dans lesquelles il n'y a pas de P-bodies (Mollet et al., 2008). L'étude montre également que dans les cellules dans lesquelles granules de stress et P-bodies forment des structures distinctes après traitement à l'arsenite et dans lesquelles RFP-DDX6 n'est pas relocalisée dans les granules de stress, la protéine était initialement concentrée dans les P-bodies et absente du cytoplasme. Au contraire, dans les cellules dans lesquelles les deux granules se contactent et dans lesquels la protéine RFP-DDX6 est relocalisée dans les granules de stress, RFP-DDX6 était initialement localisée de façon diffuse dans le cytoplasme. Cette observation montre donc que la protéine RFP-DDX6 relocalisée dans les granules de stress ne provient pas des P-bodies mais du cytoplasme. L'existence d'un trafic direct de protéines ou de mRNPs entre les deux granules n'a néanmoins pas pu être mis en évidence.

Projet de thèse

A travers cette introduction, nous avons vu l'importance de la régulation de l'expression des gènes dans divers organismes. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes, et avons passé en revue une partie des protéines et complexes multi-protéiques impliqués dans ces activités de régulation. Par leur interaction avec l'ARNm, ces protéines régulent leur stabilité, leur traduction, leur stockage sous forme réprimée ainsi que leur localisation dans divers granules cytoplasmiques.

Même si de nombreuses protéines de fonctions connues sont en partie localisées dans les P-bodies, les fonctions précises qu'assurent ces granules au point d'être conservés au cours de l'évolution chez tous les eucaryotes, de la levure à l'homme, restent énigmatiques. Aucun protocole de purification des P-bodies n'a encore été mis en place à ce jour, ce qui complique l'étude de leur composition depuis leur découverte en 2002. Plusieurs études se sont donc intéressées à comprendre l'influence que pouvaient avoir le niveau d'expression de protéines localisées dans les P-bodies sur leur assemblage. Si ces études ont montré que l'inhibition d'expression de certaines protéines entraînait la dissociation des P-bodies, notre équipe a montré qu'en induisant un stress cellulaire à l'arsenite, les P-bodies se réassemblaient. En revanche, lorsque DDX6 est déplétée dans les cellules, les P-bodies ne sont pas réassemblés, même après traitement à l'arsenite, mettant en évidence le rôle unique de DDX6 dans l'assemblage de ces granules (Serman et al., 2007).

Etudier la protéine DDX6 semblait donc être un bon point de départ pour comprendre d'avantage les fonctions qu'assurent ces granules. Comme nous l'avons vu en introduction, DDX6 est impliquée dans un grand nombre de processus biologiques liés au métabolisme de l'ARNm. En effet chez le xénope, DDX6 fait partie intégrante du complexe de répression de la traduction CPEB (Minshall and Nancy Standart, 2004). Chez *Caenorhabditis elegans*, DDX6 (CGH-1) protège les ARNm maternels lorsqu'elle est associée à GLD-1 *via* l'ARNm régulé. DDX6 est également impliquée dans la dégradation des ARNm : chez les mammifères, DDX6 interagit avec les protéines des complexes de déadénylation CCR4-NOT ; DDX6 participe également au complexe de décoiffage chez les levures, les drosophiles et les mammifères (Chan and Fritzler, 2013). Enfin, DDX6 intervient dans la voie des

miRNAs en interagissant avec les protéines du complexe RISC chez les mammifères (Chu and Rana, 2006).

Au vu de toutes les fonctions dans lesquelles DDX6 est impliquée au sein de ces différents organismes, nous avons voulu savoir quelles étaient les fonctions principales de la protéine DDX6 dans des cellules humaines. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord choisi d'identifier les partenaires protéiques de DDX6. Mon projet de thèse s'est donc intéressé à caractériser les complexes protéiques contenant l'hélicase à motif DEAD DDX6 dans des cellules épithéliales en culture.

Au début de ce projet, plusieurs hypothèses ont été faites quant aux résultats de cette analyse. D'une part, au vu des divers complexes déjà décrits et de l'abondance de DDX6 par rapport à la quantité d'ARNm dans les cellules HeLa (Ernoul-Lange et al., 2012), nous nous attendions à identifier un grand nombre de partenaires protéiques. Parmi ceux-ci, une possibilité était d'identifier la majorité voire l'ensemble des partenaires déjà décrits dans la littérature, comme partenaires protéiques de DDX6 dans les cellules humaines. Au contraire, une autre possibilité était que DDX6 serait impliquée dans un nombre limité de complexes spécifiques dans les cellules humaines. L'hypothèse de l'identification de nouveaux partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans de nouvelles voies de régulations pouvait être envisageable, posant de nouvelles questions sur les fonctions de DDX6. Enfin, la localisation subcellulaire des complexes contenant DDX6 était à explorer : peuvent-ils se localiser dans les P-bodies ? Sachant qu'ils interagissent avec DDX6, ont-ils un rôle dans l'assemblage des P-bodies ?

Après la purification des complexes protéiques contenant DDX6, les partenaires protéiques ont été identifiés en spectrométrie de masse. L'approche utilisée ainsi que sa mise au point seront détaillées dans la première partie des résultats. Les résultats d'analyse de spectrométrie de masse montrent que la majorité des protéines identifiées sont impliquées dans le métabolisme de l'ARNm. Certains complexes impliquant DDX6 et décrits dans la littérature sont effectivement identifiés dans la cellule humaine, alors que d'autres sont en partie ou totalement absents dans nos échantillons. Certains partenaires inattendus de DDX6 identifiés par cette analyse posent de nouvelles questions sur les fonctions de la protéine. C'est ce que nous verrons dans la deuxième partie des résultats. Le second objectif était de caractériser les différents complexes protéiques contenant DDX6. Les complexes ont donc été

séparés par taille sur gradient de sucrose, et certains partenaires de DDX6 localisés sur ces gradients. DDX6 fait partie d'un large spectre de complexes protéiques de tailles variées : des complexes de petite taille (<80S) et des complexes de grande taille (>80S). DDX6 est en effet associée aux polysomes dans les cellules humaines, et certains partenaires de DDX6 impliqués dans des fonctions précises pourraient bien être associés à DDX6 dans les polysomes. C'est ce que nous verrons dans la troisième partie des résultats. Des expériences complémentaires menées en parallèle au laboratoire par Marianne Bénard ont permis de tester le rôle des principaux partenaires de DDX6 dans l'assemblage des P-bodies. Si DDX6 était la seule protéine connue pour être absolument nécessaire à l'assemblage des P-bodies, ces études montrent que d'autres partenaires protéiques sont impliqués dans l'assemblage de ces granules. C'est ce que nous discuterons en quatrième de ces résultats. Nous finirons par une analyse de la purification de partenaires protéiques de DDX6 réalisées à partir de cellules HEK293 en mitose, dans lesquelles il n'y a pas de P-bodies.

Résultats

1. Purification des partenaires protéiques de DDX6 dans les cellules épithéliales de mammifères

La première étape de notre travail consistait à purifier tous les complexes protéiques contenant DDX6 à partir de cellules humaines.

1.1. Choix de l'approche expérimentale

Principe du TAP-tag

La technique de TAP-tag (*Tandem Affinity Purification*) permet la purification rapide de complexes protéiques assemblés dans les cellules. Elle a été développée en 1999 chez la levure (Rigaut et al., 1999), puis s'est avérée efficace dans d'autres types cellulaires et organismes. Cette technique repose sur l'incorporation de plusieurs étiquettes à la protéine d'intérêt, et sur son expression dans la lignée cellulaire choisie. La protéine étiquetée formera in vivo des complexes avec ses partenaires protéiques. Ces complexes protéiques seront purifiés en utilisant successivement des résines ayant une affinité pour l'une et l'autre des étiquettes. Le TAP-tag initial a été réalisé en fusionnant la CBP (*Calmoduline Binding Protéine*) et la protéine A, à la protéine d'intérêt. Un site de clivage a été inséré entre la CBP et la protéine A, permettant la purification sur une résine sur laquelle est fixée la calmoduline d'une part, puis une résine sur laquelle sont fixés des IgG (Rigaut et al., 1999). Depuis, plusieurs techniques dérivant de cette technique initiale ont été mises en place.

Mise au point de la stratégie expérimentale

La protéine DDX6 a été fusionnée aux étiquettes FLAG (1KDa) et HA (1KDa) (**Figure R1**). En effet, la petite taille de ces étiquettes est un avantage puisque cela minimise le risque d'interférer dans l'assemblage des complexes que nous cherchons à purifier. Ces étiquettes permettent la purification des complexes en ajoutant à la résine les peptides FLAG et HA en excès. L'étiquette FLAG a été fusionnée en N-terminal et HA en C-terminal de la protéine DDX6, afin de ne purifier que les complexes contenant la protéine DDX6 entière.



Figure R 1 : Schéma du plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA

Les complexes protéiques présents dans les cellules transfectées ont été purifiés en deux temps : sur une résine portant des anticorps dirigés contre une étiquette, puis sur une résine portant des anticorps dirigés contre la deuxième étiquette (**Figure R2**). Cette purification en deux étapes successives sur deux supports différents permet de réduire considérablement le bruit de fond.

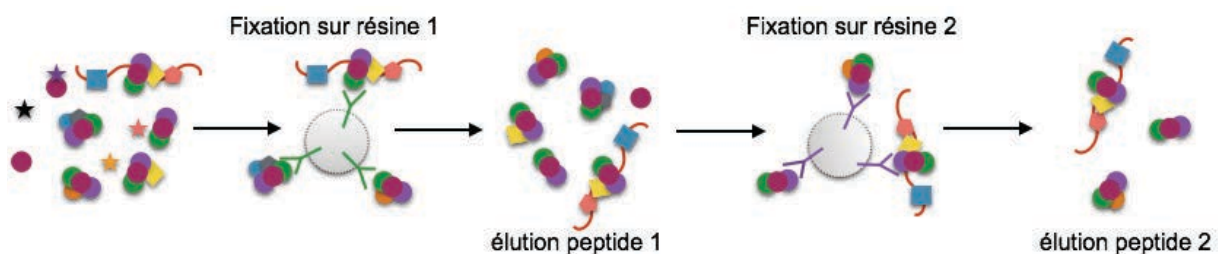


Figure R 2 : Stratégie préliminaire de purification des complexes protéiques contenant DDX6

Des cellules sont transfectées avec une protéine DDX6 étiquetée en ses 2 extrémités. Les lysats cytoplasmiques sont incubés avec une résine portant des anticorps dirigés contre l'une des étiquettes et élués avec le peptide correspondant. Ces éluats sont ensuite incubés avec une résine portant des anticorps dirigés contre l'autre étiquette et élués avec le peptide correspondant à l'autre étiquette.

Pour optimiser la double purification, l'efficacité des peptides FLAG et HA permettant l'élué des complexes adsorbés aux résines a été testée. Pour ce premier essai, nous avons utilisé des cellules HeLa transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-RFP-DDX6-HA (l'étiquette RFP est de 27 KDa), de façon à séparer davantage les protéines DDX6 endogènes (54 KDa) et recombinantes (masse théorique 82 KDa) sur gel. La double purification des complexes a été réalisée comme indiqué figure R3A. A l'issue de cette purification, les résines anti-FLAG et anti-HA ont été incubées avec du tampon Laemmli afin de décrocher les complexes non élués (**Figure R3A et B**).

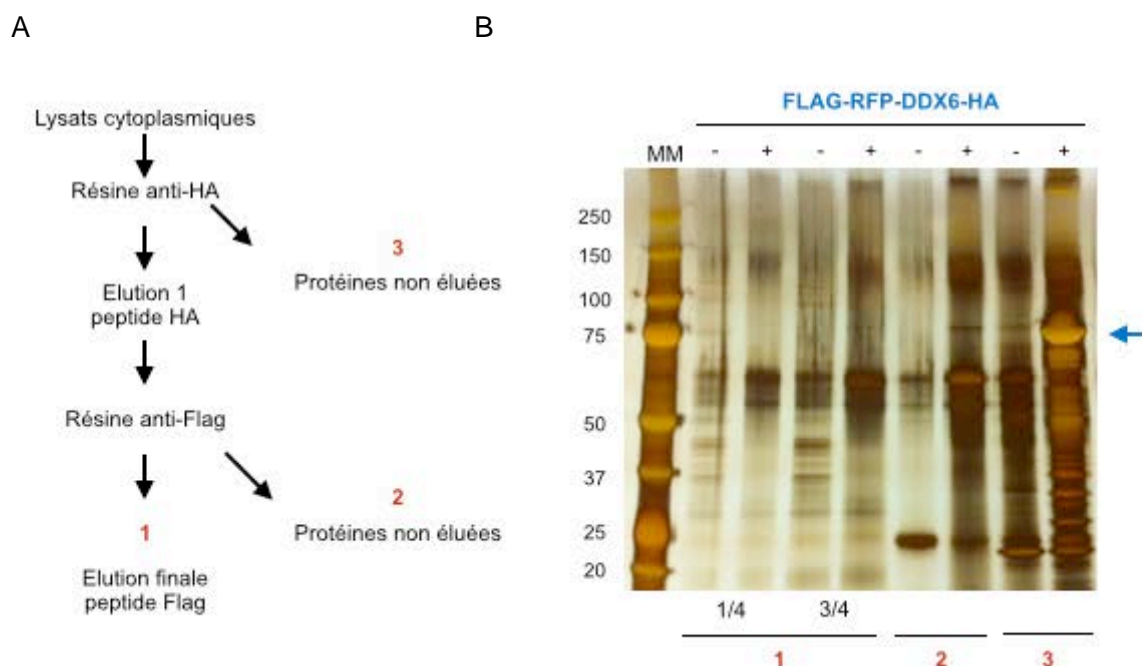


Figure R 3 : Double purification des complexes protéiques contenant la protéine FLAG-RFP-DDX6-HA

(A) Stratégie expérimentale de purification des complexes contenant la protéine FLAG-RFP DDX6-HA. (B) Séparation des éluats sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. Un quart de l'échantillon 1 a été déposé dans les puits 1 et 2, et trois quarts de l'échantillon 1 dans les puits 3 et 4. La flèche indique la localisation de la protéine FLAG-RFP-DDX6-HA.

Le peptide HA semblant peu efficace pour l'élution des complexes adsorbés sur la résine anti-HA, l'ordre de fixation sur les résines a été inversé. De plus, au vu du bruit de fond observé sur ce gel (3 dernières pistes du gel, **figure R3**), une étape supplémentaire de purification a été ajoutée, en incubant dans un premier temps les lysats cytoplasmiques avec une résine d'agarose ne portant pas d'anticorps, permettant d'éliminer les protéines se fixant à la résine de façon non spécifique.

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA. C'est l'efficacité de transfection, supérieure à 80% lors des expériences préliminaires, qui a finalement orienté notre choix vers cette lignée cellulaire (**Figure R4**).

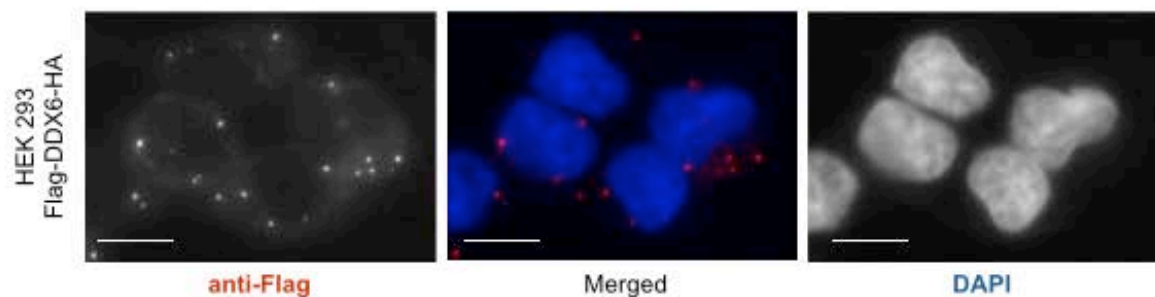


Figure R 4 : Contrôle de l'efficacité de transfection de la protéine FLAG-DDX6-HA dans les cellules HEK293

Cellules HEK293 transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA, marquées avec l'anticorps dirigé contre l'étiquette FLAG. (Echelle : 10 μ m).

Les lysats cytoplasmiques de cellules HEK293 transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA ont été incubés avec la résine anti-FLAG, l'élution s'est faite avec le peptide FLAG, puis les éluats ont à nouveau été incubés avec la résine anti-HA, l'élution finale étant réalisée avec du tampon Laemmli (**Figure R5**).

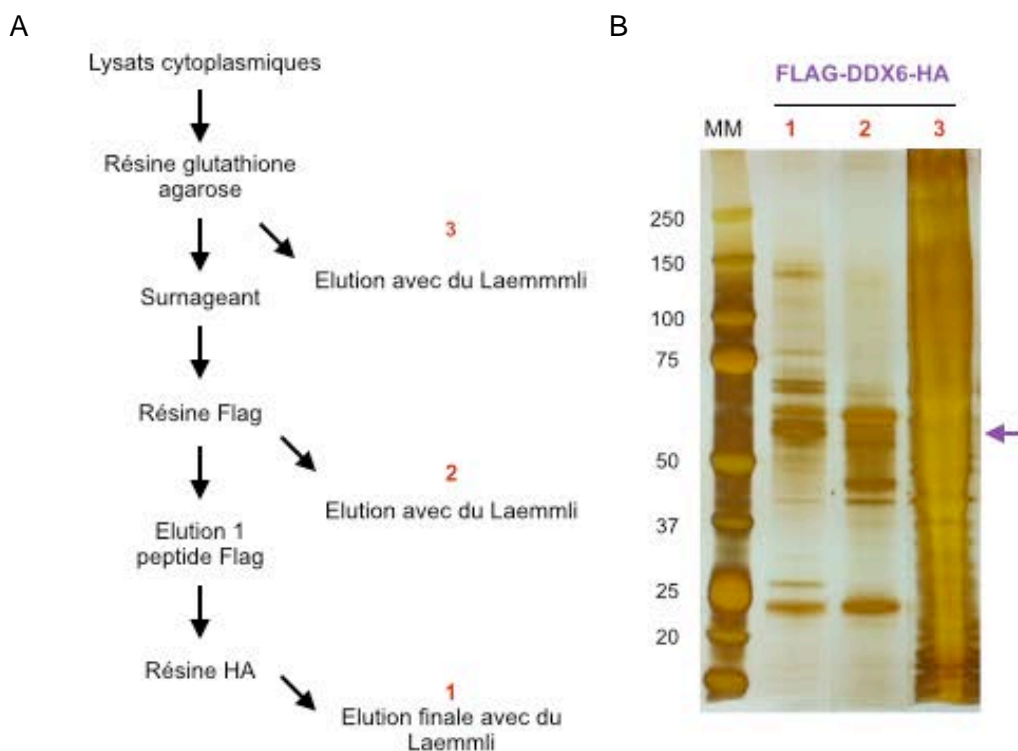


Figure R5 : Purification des complexes protéiques contenant FLAG-DDX6-HA

(A) Stratégie expérimentale de purification des complexes contenant la protéine FLAG-DDX6-HA.

(B) Visualisation des éluats sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. La flèche indique la protéine recombinante FLAG-DDX6-HA.

Etant donné la qualité de purification, cette stratégie semble optimale pour la purification des complexes protéiques contenant la protéine DDX6.

1.2. Purification à grande échelle des partenaires protéiques de DDX6

1.2.1. Processus expérimental

Dans le but de purifier une quantité suffisante de partenaires protéiques de DDX6 afin de pouvoir les détecter en spectrométrie de masse, 24 boîtes de culture cellulaire de 15 cm de cellules HEK293 (7.10^7 cellules) ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA. De plus, 12 boîtes (15 cm) ont été transfectées avec un plasmide codant pour le peptide FLAG servant de contrôle négatif. Afin de distinguer les différents types d'interaction pouvant être observés entre DDX6 et ses partenaires, *via* des interactions protéine-protéine et/ou *via* l'ARNm, des traitements ont été réalisés sur les lysats cytoplasmiques soit avec un inhibiteur de RNases, permettant de conserver tous les complexes ribonucléoprotéiques, soit en présence de RNase A ce qui permet de ne purifier que les partenaires protéiques interagissant avec DDX6 *via* des interactions protéine-protéine. La stratégie utilisée est schématisée dans la **figure R6**.

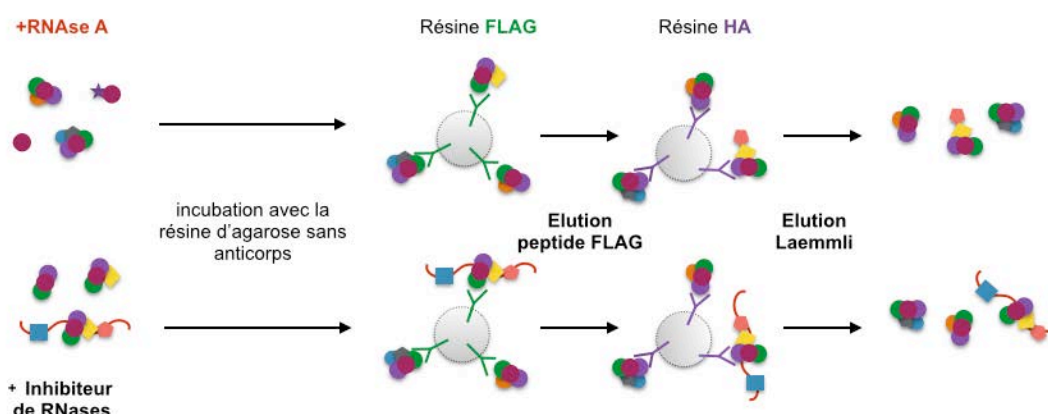


Figure R 6 : Stratégie expérimentale finale de purification à grande échelle des partenaires protéiques de DDX6

Les lysats cytoplasmiques sont traités à la RNase A ou avec un inhibiteur de RNases. Les complexes protéiques sont ensuite purifiés sur une résine portant des anticorps anti-FLAG d'une part, puis sur une résine portant des anticorps anti-HA.

1.2.2. Visualisation de la protéine DDX6 recombinante par rapport à la protéine DDX6 endogène

Pour s'assurer que le niveau d'expression final de protéine transfectée FLAG-DDX6-HA est similaire au niveau d'expression de la protéine DDX6 endogène dans les cellules HEK293, un lysat cytoplasmique de cellules HEK293 transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DD6-HA a été analysé en western blot. Le niveau d'expression des protéines DDX6 recombinantes et endogènes sont similaires (**Figure R7A**). Leur localisation subcellulaire a également été analysée en immunofluorescence et ne présente pas de différence : les protéines DDX6 recombinantes et endogènes sont localisées de façon similaire, dans le cytoplasme et dans les P-bodies (**Figure R7B**).

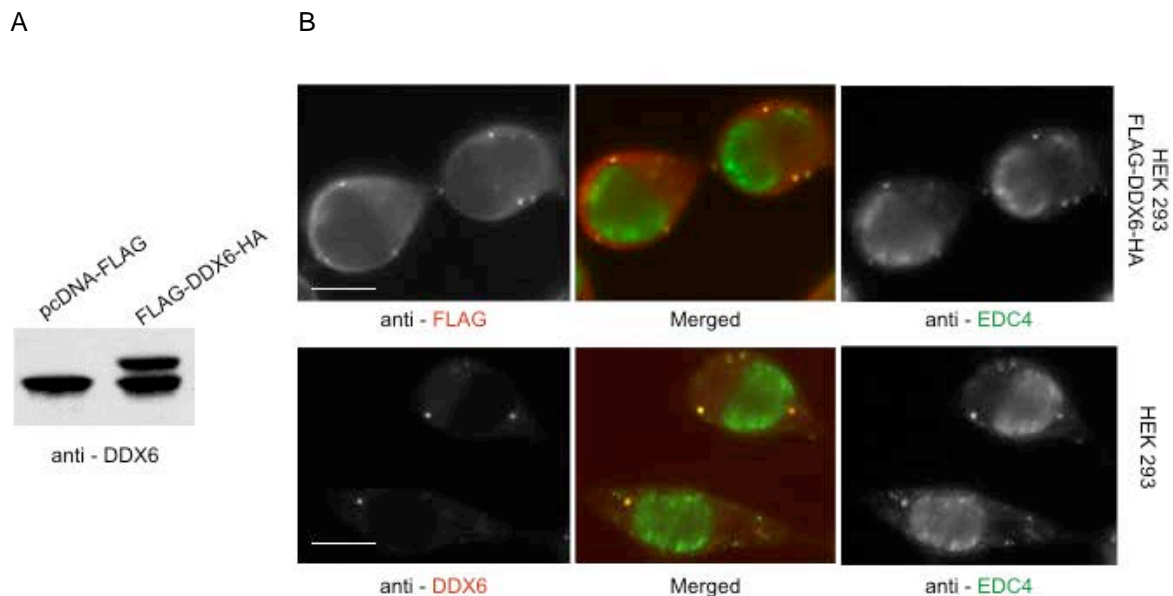


Figure R7 : Analyse de la protéine transfectée FLAG-DDX6-HA

(A) Expression des protéines DDX6 endogène et FLAG-DDX6-HA analysées en western blot avec l'anticorps dirigé contre DDX6. (B) Localisation subcellulaire des protéines DDX6 et FLAG-DDX6-HA observées dans des cellules HEK293 en microscopie optique avec les anticorps dirigés contre DDX6 et l'étiquette FLAG respectivement. La protéine EDC4 est utilisée comme marqueur des P-bodies.

Une estimation de la concentration de DDX6 dans les P-bodies et hors des P-bodies a été réalisée dans les cellules HEK293 transfectées ou non transfectées et marquées avec l'anticorps dirigé contre le peptide FLAG ou contre la protéine DDX6 endogène respectivement (ImageJ) (**Figure R8**). D'après ces estimations, DDX6 est enrichie d'un facteur 10 dans les P-bodies dans les 2 cas (DDX6 recombinante ou endogène), en comparaison avec sa concentration dans le cytoplasme. Ces estimations nous permettent donc de dire qu'il n'y a pas de différence entre les protéines DDX6 endogènes et transfectées en terme de concentration dans les P-bodies.

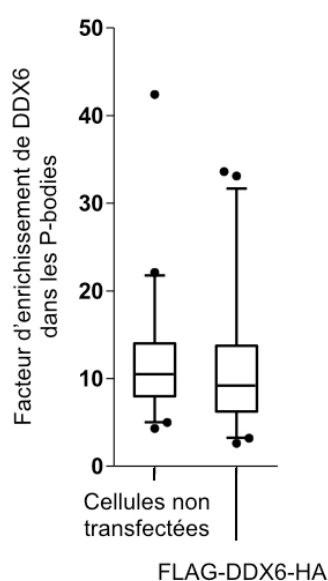


Figure R 8 : Estimation de l'enrichissement de DDX6 dans les P-bodies, dans les cellules HEK293

L'intensité de fluorescence a été analysée dans 94 P-bodies, dans des cellules non transfectée, et dans 90 P-bodies dans des cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA.

Néanmoins, l'enrichissement mesuré ainsi est sous-estimé par rapport à une quantification faite en microscopie électronique. En effet, une quantification précise de la protéine DDX6 en dehors et dans les P-bodies, effectuée en microscopie électronique sur des coupes ultra fines de cellules HeLa immunomarquées, avait montré précédemment que l'enrichissement de la protéine DDX6 dans les P-bodies est de 170 fois (Ernoul-Lange et al., 2012). En prenant en compte la taille et le nombre de P-bodies dans ces cellules, cela signifie également que 94% de la protéine est localisée hors des P-bodies (Ernoul-Lange et al., 2012), et donc que les complexes purifiés par TAP-tag sont en majorité des complexes diffus dans le cytoplasme.

1.2.3. Contrôle de la qualité de purification

La qualité de purification a été vérifiée en analysant un dixième des éluats sur gel dénaturant, coloré au nitrate d'argent (**Figure R9A**). Elle semble optimale, avec un grand nombre de protéines et peu de bruit de fond. Les neuf dixièmes restants ont été analysés en spectrométrie de masse. Les éluats ont été chargés sur gel dénaturant (**Figure R9B**). Ce gel a été migré sur 2 centimètres puis coloré au bleu de Coomassie (compatible avec la spectrométrie de masse). Les pistes contrôle (pcDNA-FLAG) et FLAG-DDX6-HA (RNase et RNase out) ont été découpées et envoyées à la plateforme de protéomique de l'Université de Cambridge.

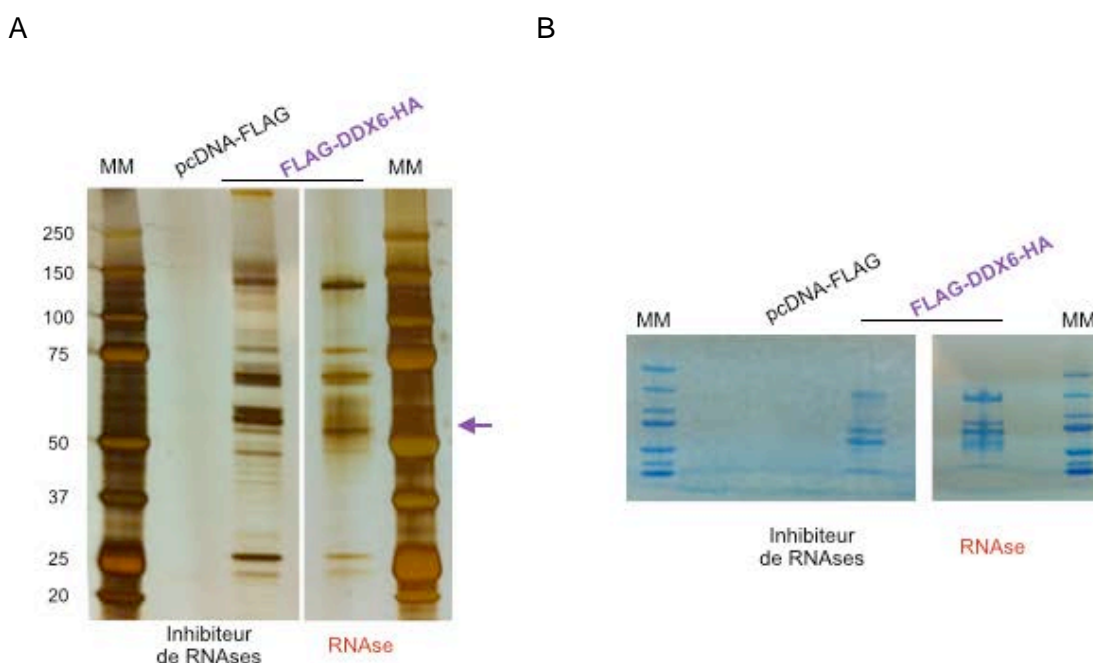


Figure R9 : Analyse de la qualité de purification et préparation des échantillons pour l'envoi en spectrométrie de masse

(A) Un dixième des éluats a été déposé sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent pour contrôler la qualité de la purification. La flèche indique la protéine recombinante FLAG-DDX6-HA (B) Neuf dixièmes des éluats ont été déposés sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie.

2. Identification des partenaires protéiques de DDX6 par spectrométrie de masse

2.1. Technique de spectrométrie de masse utilisée par la plateforme de protéomique de Cambridge

Etant donné le grand nombre de partenaires protéiques de DDX6 attendu et la complexité du mélange de protéines observée sur gel à l'issue du TAP-tag, chaque piste a été découpée en 6 bandes afin de réduire la complexité du mélange, et d'améliorer la sensibilité de détection en spectrométrie de masse. Après digestion à la trypsine, les peptides extraits du gel ont été séparés sur une colonne de chromatographie en phase liquide (LC). Ils ont ensuite été ionisés dans un easy-spray avant d'être analysés en tandem (MS/MS) : les ions générés ont été analysés une première fois, puis les ions stables issus de cette première analyse ont été cassés dans une cellule de collision et analysés une seconde fois.

Les spectres des peptides obtenus ont été analysés avec le logiciel Mascot, un algorithme d'identification de protéines qui compare les masses peptidiques obtenues expérimentalement avec celles calculées théoriquement à partir des séquences protéiques correspondantes, regroupées dans une banque de données (Uniprot humaine dans notre cas). Cet algorithme permet de calculer un score Mascot. Plus il est élevé, plus l'identification de la protéine est fiable. La plateforme de spectrométrie de masse nous a fourni des résultats sous forme d'un tableau comportant le nom des protéines identifiées et leur code d'accèsion sur les plateformes de protéomique, leur P-value, leur masse, les peptides identifiés et leur nombre, ainsi que le pourcentage de recouvrement des protéines identifiées.

2.2. Analyse des données de spectrométrie de masse

Sans tenir compte des 48 protéines identifiées dans l'échantillon contrôle, 367 protéines ont été identifiées dans l'échantillon traité avec l'inhibiteur de RNases, et 323 protéines dans l'échantillon traité à la RNase A. Les scores s'étendent de 2435 à 29 pour l'échantillon avec inhibiteur de RNases, et de 3230 à 29 pour l'échantillon avec RNase A. En considérant comme plus fiable l'identification des protéines basée sur au moins deux peptides, les protéines identifiées à l'aide d'un seul peptide ont été retirées de notre analyse.

Les listes sont alors limitées à 299 protéines interagissant avec DDX6 *via* des interactions protéine-protéine et/ou *via* l'ARN (inhibiteur de RNases), et 233 protéines interagissant avec DDX6 *via* des interactions protéine-protéine (RNase A) (**Figure R10**).

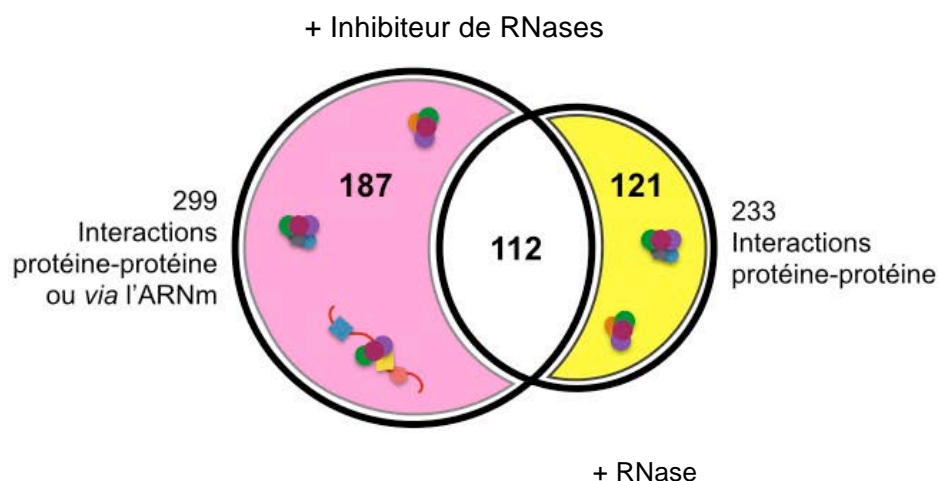


Figure R10 : Résultats de la spectrométrie de masse

112 protéines sont communes aux 2 échantillons. En supprimant l'ARNm par traitement RNase, 187 protéines ne sont plus identifiées dans les échantillons. De façon inattendue, 121 protéines sont identifiées exclusivement dans l'échantillon traité à la RNase A. Parmi elles, 72% ont un score inférieur à 115. En comparaison, sur les 187 protéines identifiées exclusivement dans l'échantillon traité à l'inhibiteur de RNases, 45% ont un score inférieur à 115. Une possibilité est donc que parmi les 121 protéines identifiées dans l'échantillon traité à la RNase A, certaines sont faiblement représentées dans l'échantillon traité à l'inhibiteur de RNases et passent en dessous du seuil de détection. Une autre explication est que ces 121 protéines font partie de complexes contenant DDX6 dont les étiquettes sont inaccessibles aux anticorps en présence d'ARN.

Les 20 protéines identifiées avec les meilleurs scores dans les deux échantillons sont indiquées dans un tableau en **annexe 2**.

2.3. Analyse qualitative des résultats de spectrométrie de masse

Les fonctions des protéines identifiées ont été analysées sur le site « Gene Ontology » (GO). Ce site annote les fonctions moléculaires des protéines et leur implication dans divers

processus biologiques, dans différents organismes modèles. A partir d'une liste de protéines et d'un organisme donné, GO permet donc de déterminer dans quelle(s) grande(s) fonction(s) moléculaire(s) ces protéines sont impliquées, en calculant une valeur statistique P (« P-value »), représentant l'enrichissement des protéines impliquées dans ces grandes fonctions. Les résultats de l'analyse sur GO indiquent que la majorité des protéines identifiées dans les échantillons traités à l'inhibiteur de RNases (226 protéines sur les 292 annotées dans GO) ou à la RNase A (112 protéines sur les 229 protéines annotées dans GO) sont impliquées dans le métabolisme de l'ARN (GO 0003723), avec des P-values de 10^{-197} et 10^{-64} , respectivement (**Figure R11**).

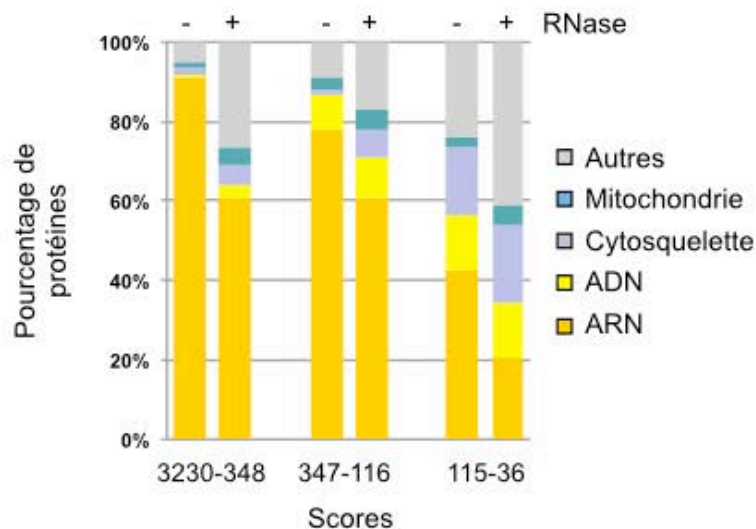
	Inhibiteurs de RNases				RNase A			
Scores	tous	3230-348	347-116	115-36	tous	3230-348	347-116	115-36
Protéines annotées dans GO	292	99	99	94	229	60	58	111
« RNA Binding »	226	91	83	52	112	41	38	33
P-value	10^{-197}	10^{-94}	10^{-78}	10^{-33}	10^{-64}	10^{-31}	10^{-28}	10^{-11}

Figure R11 : Tableau récapitulatif de l'analyse réalisée sur GO, de l'enrichissement des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN

On remarque que même les protéines identifiées avec de bas scores sont majoritairement impliquées dans le métabolisme de l'ARN, avec des P-values significatives dans les deux échantillons. Cela montre que même parmi les protéines identifiées avec de faibles scores se trouvent certainement des protéines liées à DDX6 *via* des interactions protéines-protéines ou *via* l'ARN. Il y a donc un fort enrichissement des protéines liées au métabolisme de l'ARN dans notre liste de partenaires de DDX6, que ce soit pour les protéines identifiées avec de hauts scores, que pour les protéines identifiées avec de faibles scores. Les protéines identifiées ont également été annotées manuellement d'après les données de la

littérature. (**Figure R12A**). Le faible nombre de protéines mitochondriales et du cytosquelette atteste de la qualité de purification.

A



B

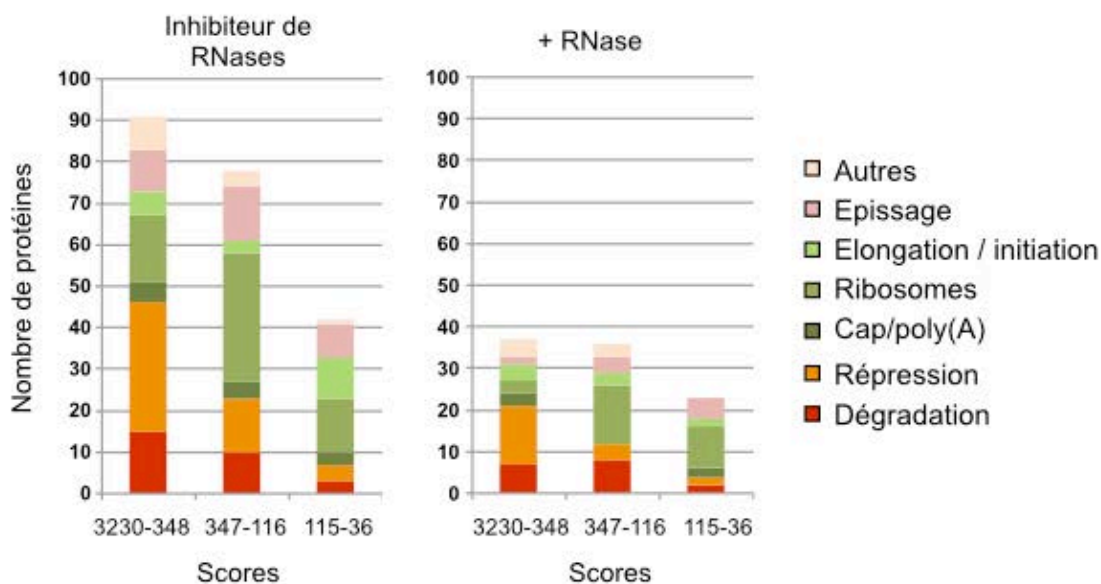


Figure R 12 : Annotation manuelle des protéines identifiées en spectrométrie de masse

(A) Les protéines purifiées sont rangées par score et divisées de façon arbitraire en 3 groupes de scores. Leur appartenance à une catégorie fonctionnelle a été choisie à partir de la littérature. (B) Les protéines de la catégorie des ARN en (A) ont été classées en sous-catégories, à partir de la littérature.

En annotant plus en détail les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN, trois grandes classes de partenaires protéiques de DDX6 sont majoritairement représentées (**Figure R12B**) : les protéines impliquées dans la dégradation des ARNm, les protéines impliquées dans la répression des ARNm et les protéines ribosomales qui sont également largement représentées, mais ce sujet sera abordé en 2.3.3.3.

2.3.1. DDX6 est impliquée dans des complexes de dégradation des ARNm

Au total, 28 protéines impliquées dans la dégradation des ARNm interagissent avec DDX6 : 27 sont identifiées dans l'échantillon traité à l'inhibiteur de RNases, et 17 dans l'échantillon traité à la RNase A.

Parmi ces 28 protéines, 4 protéines du complexe de décoiffage DCP1A, DCP1B, EDC3 et EDC4 sont identifiées parmi les 20 partenaires ayant les meilleurs scores Mascot. Dans le reste de la liste se trouvent également XRN1 et XRN2, DCP2, LSM1, LSM2, LSM3, LSM4, LSM6 et LSM7 (**Figure R13A**). Absente des lysats traités à la RNase A, XRN2 pourrait interagir avec DDX6 *via* l'ARNm uniquement. Afin de s'assurer que ces interactions ne sont pas artificiellement favorisées par l'expression de la protéine recombinante FLAG-DDX6-HA, des immunoprécipitations avec la protéine DDX6 endogène dans des cellules non transfectées ont été réalisées. Les protéines EDC3, EDC4, DCP1A et XRN1 coprécipitent avec la protéine DDX6 endogène, en présence et en absence d'ARNm (**Figure R13B**).

Les données de western blot ont été quantifiées pour comparer la fraction de chaque partenaire protéique s'associant à DDX6 (**Figure R13B**). Plusieurs observations peuvent être faites. D'une part, une grande fraction des protéines EDC3 et DCP1A coprécipite avec DDX6, indépendamment de l'ARNm. Cela montre que DDX6 est un partenaire principal des facteurs de décoiffage EDC3 et DCP1A dans les cellules HEK293. D'autre part, dans le cas d'EDC4 où seule une petite fraction de protéine coprécipite avec DDX6, on ignore si l'interaction est faiblement représentée dans les cellules, ou si elle a été perdue au cours de la purification. Lorsque les lysats sont traités à la RNase A, une plus grande fraction de la protéine EDC4 coprécipite de façon systématique avec la protéine DDX6 endogène. Une hypothèse est donc que l'épitope de DDX6 est probablement plus accessible en absence d'ARNm lorsque DDX6 est en complexe avec EDC4. Enfin, l'interaction entre DDX6 et XRN1 dépend partiellement de la présence d'ARNm.

A

	Inhibiteur RNases	RNase
DCP1A	1974	2243
DCP1B	1807	2067
EDC3	2194	2235
EDC4	1043	2904
XRN1	851	316
XRN2	119	0
LSM1	244	153
LSM2	389	325
LSM3	58	34
LSM4	294	214
LSM6	207	158
LSM7	101	111

TOP 20

B

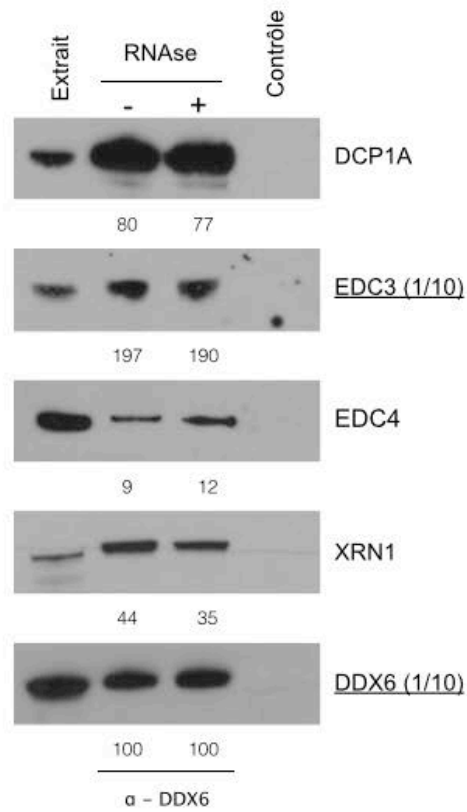


Figure R13 : Partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans la dégradation des ARNm

(A) Tableau des scores des partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans la dégradation des ARNm. (B) Coprécipitation des partenaires protéiques de DDX6 avec la protéine DDX6 endogène, à partir de lysats de cellules HEK293 non transfectées.

2.3.2. DDX6 est impliquée dans des complexes de répression de la traduction des ARNm

50 partenaires protéiques de DDX6 identifiés en spectrométrie de masse sont impliqués dans des complexes de répression de la traduction des ARNm. Parmi ceux-ci, 48 protéines sont identifiées dans les lysats traités à l'inhibiteur de RNases, et 20 dans les lysats traités à la RNase A.

Parmi les 20 protéines identifiées avec les meilleures scores se trouvent 4 protéines du complexe de répression CPEB : 4E-T, PAT1B, LSM14A et LSM14B (**Figure R14A**).

Les interactions entre DDX6 et les facteurs 4E-T, PAT1B, LSM14A et LSM14B ont été confirmées par coprécipitation avec la protéine DDX6 endogène. A part pour PAT1B, ces interactions sont partiellement dépendantes de l'ARNm (**Figure R14B**).

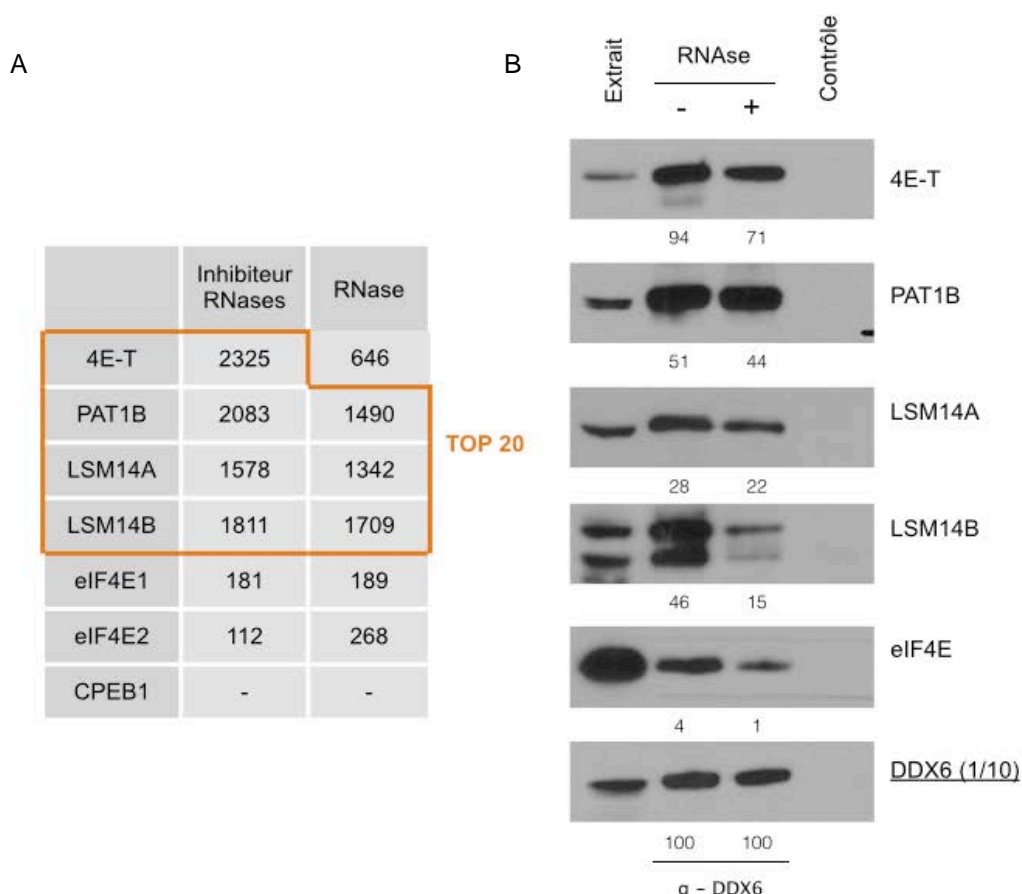


Figure R 14 : Partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans la répression de la traduction des ARNm

A) Tableau des scores des partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans la répression des ARNm. **(B)** Co-immunoprécipitations des partenaires protéiques de DDX6 avec la protéine DDX6 endogène, à partir de lysats de cellules HEK293 non transfectées.

La protéine CPEB1 n'est pas identifiée. Deux études pourraient expliquer son absence. D'une part, la protéine CPEB1 est détectée de façon faible dans les cellules HeLa, en immunofluorescence ainsi qu'en western blot (Ernoul-Lange et al., 2009). D'autre part, dans une analyse quantitative de protéome à partir de cellules HeLa, la protéine CPEB1 n'est pas détectée (Nagaraj et al., 2014). Une hypothèse est donc que la protéine CPEB1 est trop faiblement exprimée pour être détectées dans nos échantillons.

2.3.3. DDX6 est impliquée dans un complexe cytoplasmique composé des protéines ataxin 2 et 2-like

Les protéines ataxin 2 (ATXN2) et ataxin-2-like (ATXN2L) ont été identifiées parmi les 20 meilleurs scores en présence d'inhibiteurs de RNases, et avec les 2 meilleurs scores dans les lysats traités avec la RNase A (**Figure R15A**). Les fonctions de ces protéines seront abordées dans la partie discussion. Néanmoins, il convient de signaler que le complexe cytoplasmique décrit contenant DDX6 et les ataxin 2 et 2-like contient également les protéines PABP, G3BP et LSM12 (Kaehler et al., 2012; Nonhoff et al., 2007). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces protéines dans l'analyse de la spectrométrie de masse, et en copréciptation. Dans notre expérience, les protéines PABPC1, PABPC4, PABPC3, LSM12 et G3BP sont identifiées (**Figure R15A**).

Comme le montrent les expériences d'immunoprécipitation, les interactions entre DDX6 et les protéines ATXN2, ATXN2L, PABPC1, PABPC3 et LSM12 (**Figure R15B**) sont majoritairement résistantes au traitement à la RNase A, à part pour LSM12 qui est partiellement sensible au traitement (Figure R15B). Dans nos expériences, la protéine G3BP2 ne coimmunoprécipite pas avec la protéine DDX6 endogène dans les cellules HEK293 (Figure R13B). Pourtant, l'analyse quantitative du protéome dans les cellules HeLa montre que les isoformes G3PB1 et G3PB2 sont abondantes dans ces cellules, et sont même plus abondantes que DDX6. Une hypothèse est que même si G3BP est très abondante dans nos cellules, le complexe qu'elle partage avec DDX6 est minoritaire à côté des complexes dans lesquels elle est impliquée avec d'autres partenaires. De ce fait, en purifiant les complexes par l'intermédiaire de la protéine DDX6, c'est une infime partie de G3BP qui coprécipterait dans nos échantillons, la rendant indétectable dans les échantillons purifiés. DDX6 pourrait peut-être copréciptier avec G3BP, en purifiant les complexes par l'intermédiaire de la protéine G3BP.

A

TOP 20

	Inhibiteur RNases	RNase
ATXN2L	2127	3230
ATXN2	2305	3047
PABPC1	2359	2431
PABPC3	1131	1206
PABPC4	2360	2603
G3BP2	955	1417
LSM12	430	591

TOP 2

B

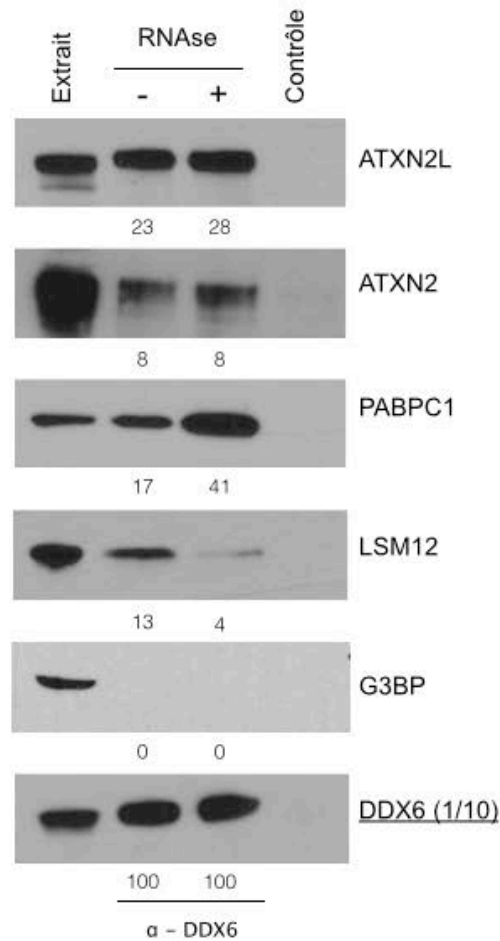


Figure R15 : Partenaires de DDX6 partageant un complexe cytoplasmique impliqué dans le métabolisme de l'ARN

(A) Tableau de scores des partenaires protéiques de DDX6 impliqués dans le complexe cytoplasmique composé notamment des ataxin 2 et ataxine 2-like (B) Co-immunoprécipitations des partenaires protéiques de DDX6 avec la protéine DDX6 endogène, à partir de lysats de cellules HEK293 non transfectées.

2.3.4. Les protéines du cœur du complexe de jonction d'exons (EJC)

Les 4 protéines qui constituent le cœur de l'EJC, Y14, MLN51, eIF4A3 et Magoh ont été identifiées comme partenaires protéiques de DDX6 dans les lysats cytoplasmiques traités à l'inhibiteur de RNases (**Figure R16A**). D'après nos expériences d'immunoprécipitation, toutes ces interactions s'avèrent sensibles au traitement à la RNase A, en accord avec les résultats de spectrométrie de masse (**Figure R16B**).

A

	Inhibiteur RNases	RNase
MLN51	187	-
eIF4A3	592	-
Y14	77	-
Magoh	193	-
PABPN1	-	78
NCBP1	1011	-

B

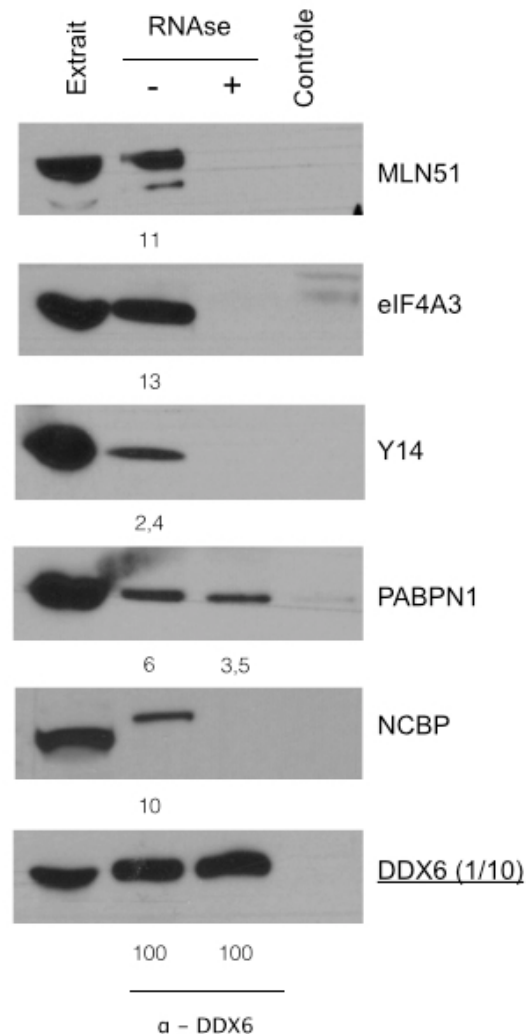


Figure R16 : Les protéines du cœur du complexe de jonction d'exons interagissent avec DDX6

(A) Tableau de scores des protéines du cœur du complexe de jonction d'exons. (B) Co-immunoprécipitations des protéines du cœur de l'EJC, MLN51, eIF4A3, Y14 et les protéines PABPN1 et NCBP avec la protéine DDX6 endogène, à partir de lysats de cellules HEK293 non transfectées.

Les protéines PABPN1 et NCBP sont également identifiées en spectrométrie de masse. Dans la cellule, l'EJC est dissocié de l'ARNm au premier passage du ribosome et les protéines nucléaires protégeant la coiffe CBP20/CP80 (NCBP) et la queue poly(A) (PABPN1) sont remplacées par les protéines cytoplasmiques, eIF4E et PABPC1 respectivement. DDX6 interagissant avec PABPN1 et NCBP (**Figure R16B**), une hypothèse est donc que DDX6 pourrait se lier à des ARNm à la sortie du noyau, avant même qu'ils soient balayés par la machinerie de traduction pour initier leur premier cycle de traduction.

Une autre hypothèse serait que l'EJC n'est pas systématiquement dissocié de l'ARNm au premier balayage de l'ARNm par le ribosome.

2.3.5. Les protéines ribosomales

Les protéines ribosomales sont abondantes dans les cellules. Elles sont de ce fait souvent présentes dans les analyses de spectrométrie de masse, et considérées comme contaminantes. Dans notre analyse, un grand nombre de protéines ribosomales ont été identifiées, avec de hauts scores (Figure R17). En effet, 49 des 55 protéines des sous-unités 40S (21 protéines) et 60S (34 protéines) du ribosome sont identifiées dans les lysats traités avec l'inhibiteur de RNases. Après traitement à la RNase A, 28 protéines ribosomales sont identifiées, dont une majorité avec des scores très faibles.

	Inhibiteur RNase	RNase
Protéines de la sous unité 40S du ribosome	19 (scores : 837 - 61)	12 (scores : 646 - 70)
Protéines de la sous unité 60S du ribosome	30 (scores : 541- 55)	16 (scores : 449 - 57)

Figure R17 : Protéines ribosomales identifiées comme partenaires protéiques de DDX6

Tableau de scores des protéines ribosomales identifiées comme partenaires protéiques de DDX6.

Au vu des hauts scores avec lesquels de nombreuses protéines ribosomales ont été identifiées, nous avons voulu savoir si DDX6 pouvait se lier à des ARNm en cours de traduction dans les cellules HEK293 comme cela a été montré chez la levure (Sweet et al., 2012).

3. Caractérisation des complexes protéiques contenant la protéine DDX6

Pour savoir si DDX6 peut interagir avec des ARN en cours de traduction, et de façon plus générale, pour caractériser certains des complexes contenant DDX6 identifiés en spectrométrie de masse, des lysats cellulaires ont été fractionnés sur gradients de sucrose. Par ultracentrifugation, nous avons ainsi pu séparer les « fractions légères » (40S, 60S, et 80S), des « fractions lourdes » (polyribosomes). Les protéines ainsi fractionnées ont été collectées

et analysées par western blot. Le profil de sédimentation a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre lisant la densité optique à 254 nm, et relié à une imprimante (Teledyne Isco).

3.1. DDX6 est impliquée dans des complexes protéiques de différentes tailles

Le profil de sédimentation de la protéine DDX6 montre qu'elle est présente dans des complexes de différentes tailles (**Figure R18**).

D'une part, la majorité de la protéine DDX6 est localisée dans des fractions légères, suggérant que DDX6 est principalement impliquée dans des complexes de petites tailles (<80S) (**Figure R18A**). D'autre part, une petite fraction de la protéine DDX6 est localisée au niveau des polysomes (**Figure R18A**). DDX6 pourrait donc être associée aux polysomes ou impliquée dans des complexes de grandes tailles, indépendamment des polysomes. Pour trancher entre ces deux hypothèses, les cellules HEK293 ont été traitées à la cycloheximide, inhibiteur de la traduction conduisant à l'accumulation des polysomes sur l'ARNm (**Figure 18B**). Les lysats cytoplasmiques ont été fractionnés sur gradient de sucrose.

L'accumulation des polysomes sur les ARNm entraîne une accumulation de la protéine DDX6 dans ces fractions, montrant qu'une fraction de DDX6 est bien associée aux polysomes (**Figure 18B**). Les hypothèses pouvant expliquer cette interaction entre DDX6 et les ARNm en cours de traduction seront abordées dans la partie « discussion et perspective ».

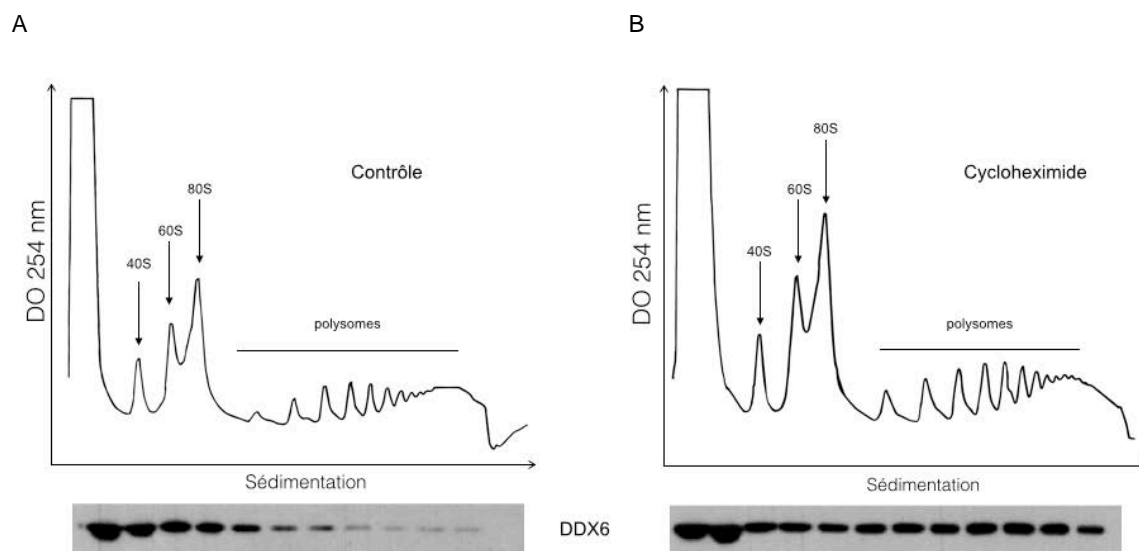


Figure R18 : Localisation de la protéine DDX6 sur gradients de sucrose

(A) Profil de Sédimentation de la protéine DDX6 à partir de lysats cytoplasmiques de cellules HEK293 non traitées (B) Profil de Sédimentation de la protéine DDX6 à partir de lysats cytoplasmiques de cellules HEK203 traitées à la cycloheximide.

3.2. Analyse de certains partenaires protéiques de DDX6 sur gradients de sucrose

DDX6 étant impliquée dans des complexes de tailles variées, les profils de sédimentation de certains de ses partenaires protéiques ont été analysés sur gradients de sucrose dans le but identifier ceux dont une fraction pouvait être associée aux polysomes et ceux qui sont plutôt impliqués dans des complexes de petites tailles.

La protéine LSM14A impliquée dans la répression de la traduction des ARNm et les protéines EDC4 et EDC3 impliquées dans le décoiffage des ARNm ont été analysées (**Figure R19**). D'une part, toutes ces protéines partagent avec DDX6 des complexes de petites tailles (**Figure R19A**). D'autre part, lorsque les cellules sont traitées à la cycloheximide, une fraction de la protéine LSM14A s'accumule dans les polysomes de la même façon que DDX6, alors que la distribution de la protéine EDC4 le long du gradient reste inchangée malgré le traitement, montrant que la protéine EDC4 ne s'associe pas aux polyribosomes (**Figure R19B**). Enfin, EDC3 semble très abondante tout le long du gradient, formant des complexes de petites tailles et de grandes tailles, indépendamment des polysomes.

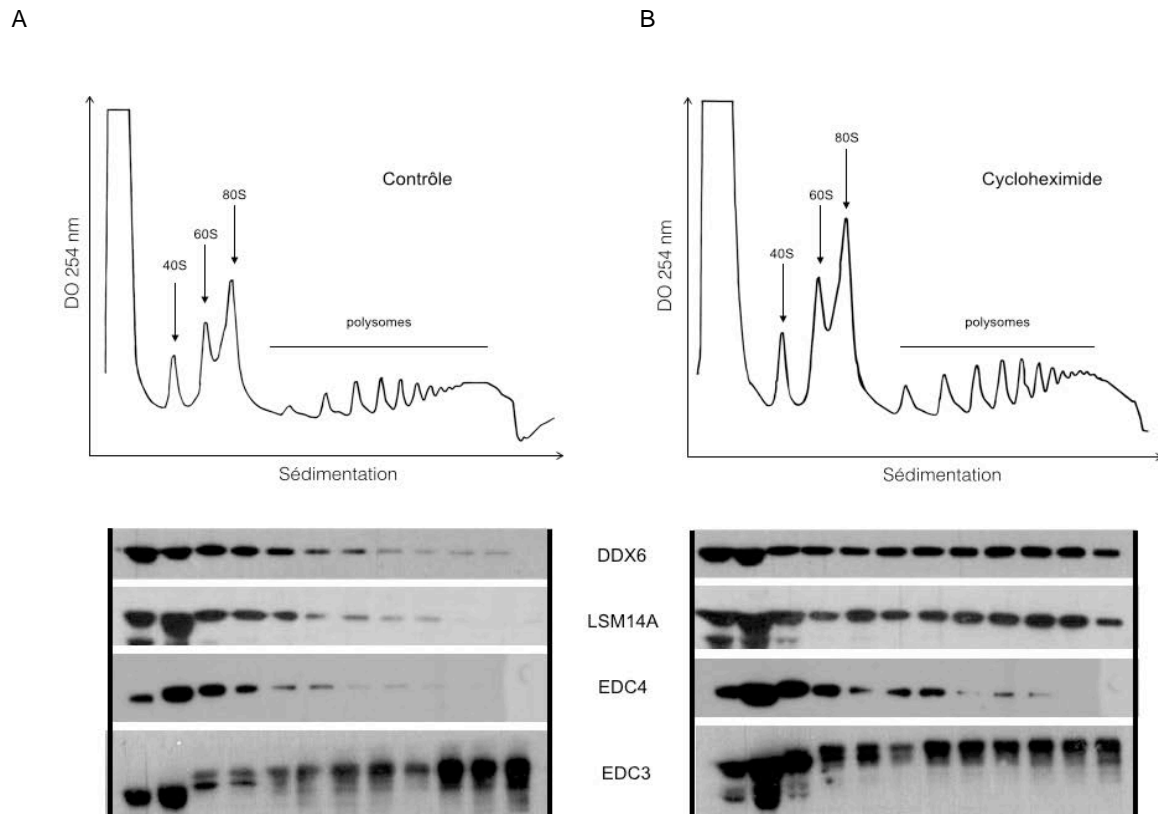


Figure R 19 : Localisation des protéines DDX6, LSM14A, EDC4 et EDC3 sur gradients de sucrose

(A) Profil de sédimentation des protéines DDX6, LSM14A, EDC4 et EDC3 sur gradients de sucrose, à partir de lysats cytoplasmiques de cellules HEK293 non traitées (B) Profil de sédimentation des protéines DDX6, LSM14A, EDC4 et EDC3 sur gradient de sucrose, à partir de lysats cytoplasmiques de cellules HEK203 traitées à la cycloheximide.

Ainsi, parmi les trois protéines testées, seule celle impliquée dans la répression de la traduction, Lsm14A, est associée aux polysomes comme DDX6. Au vu de ces observations, les protéines du complexe de répression devraient être analysées sur gradient de sucrose pour savoir si l'ensemble du complexe de répression interagit avec les ARNm en cours de traduction.

4. Maintien des P-bodies dans les cellules HeLa

Nous avons voulu savoir si certains partenaires protéiques de DDX6 identifiés en spectrométrie de masse pouvaient avoir une influence dans le maintien des P-bodies et leur assemblage *de novo* dans les cellules humaines.

Des expériences conduites en parallèle au laboratoire par Marianne Bénard se sont donc intéressées aux partenaires de DDX6 qui pouvaient influencer le maintien des P-bodies dans les cellules humaines. L'effet de l'inhibition de l'expression de certains partenaires majoritaires de DDX6 a été comparé à l'effet de l'inhibition de DDX6 sur le maintien de ces granules.

Les cellules HeLa ont été utilisées dans cette analyse, leur propriété physique les rendant plus appropriées pour la visualisation en microscopie optique (elles sont en effet plus plates que les HEK293). Elles ont été transfectées avec des siRNAs dirigés contre les protéines DDX6, EDC3, EDC4, PAT1B, 4E-T, ATXN2, ATXN2L, LSM14A ou LSM14B. Les P-bodies ont ensuite été observés en immunofluorescence et comptés (**Figure 5B** dans la publication en **annexe 1** et **R20** issue de la publication).

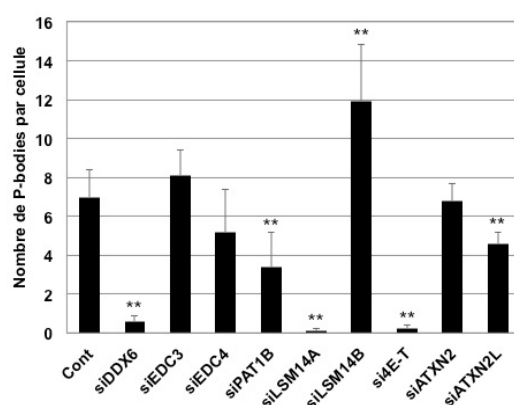


Figure R20 : Rôle des partenaires protéiques de DDX6 dans le maintien des P-bodies

Des cellules HeLa ont été transfectées avec des microARN dirigés contre les différentes protéines indiquées en abscisse. 48h après, les P-bodies ont été comptés, les résultats de comptage reportés sur l'histogramme étant les moyennes des comptages de 3 expériences similaires et indépendantes.

L'inhibition d'expression de DDX6 et de certains de ses partenaires protéiques de DDX6 a un effet important sur le maintien des P-bodies. Lorsque l'expression des protéines 4E-T, DDX6 ou LSM14A est inhibée, les P-bodies sont complètement dissociés dans les cellules HeLa (**Figure R20**), en accord avec la littérature (Chu and Rana, 2006; Ferraiuolo et al., 2005; Yang et al., 2006). En revanche, certains partenaires de DDX6 semblent tenir un rôle moins important dans le maintien des P-bodies. C'est le cas des protéines PAT1B et EDC4 dont la déplétion entraîne une diminution du nombre de P-bodies de 50% et 24%

respectivement. Cet effet de PAT1B sur le maintien des P-bodies avait déjà été documenté au laboratoire, dans les cellules HeLa (Marnef et al., 2010). Enfin, l'inhibition des protéines EDC3 et ATXN2 n'a aucun effet sur le maintien des P-bodies, alors que la déplétion d'ATXN2L entraîne une très faible diminution du nombre de granules. Pour finir, l'inhibition d'expression de la protéine LSM14B a pour effet l'augmentation du nombre de P-bodies.

En comparaison avec les observations faites dans la littérature, Yu et al., 2005 montrent une dissociation totale des P-bodies dans 80% des cellules humaines Hep-2 dans lesquelles l'expression d'EDC4 est inhibée, et (Kaehler et al., 2012) observent une diminution de 38% du nombre de P-bodies dans les cellules déplétées pour ATXN2L. Ces différences peuvent être dues à une différence dans le protocole suivi, avec des temps plus ou moins long d'inhibition d'expression de ces protéines.

En résumé, ces résultats mettent en avant le rôle majeur des protéines DDX6, LSM14A et 4E-T dans le maintien des P-bodies. PAT1B et EDC4 semblent également avoir une influence mineure sur leur maintien dans les cellules HeLa.

Des expériences de complémentation ont été réalisées pour savoir si le domaine de DDX6 lui permettant d'interagir avec le motif FDF/DW de LSM14A, PAT1B et EDC3 pouvait être importante dans l'assemblage des P-bodies. Le plasmide codant pour la protéine DDX6 mutée (mutation « mut1 » : les acides aminés Gln309, His312, Thr316 et Arg320 sont substitués par des alanines) a été utilisé (Tritschler et al., 2009). Mut1 a été transfecté dans des cellules HeLa déplétées pour la protéine DDX6 endogène. Les cellules n'exprimant que la version mut1 de DDX6 présentent 2 fois moins de P-bodies que les cellules sauvages (**Figure R21**). Le domaine de DDX6 lui permettant d'interagir avec les motifs FDF/DW de ces partenaires est donc important dans le maintien des P-bodies. Puisque l'inhibition d'expression d'EDC3 n'a aucune influence sur le maintien des P-bodies, l'interaction de DDX6 avec LSM14A ou PAT1B *via* leur motif FDF/DW facilite le maintien des granules dans les cellules humaines.

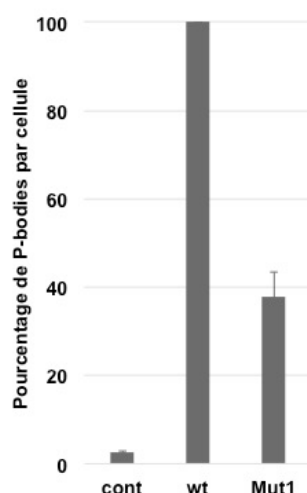


Figure R21 : Expérience de complémentation avec le mutant de DDX6 « mut1 »

Des cellules HeLa ont été transfectées avec un siARN dirigé contre la protéine DDX6. 24h après, elles ont été transfectées avec un plasmide codant pour la version sauvage de DDX6 (WT) ou pour la version mutée de DDX6 (Mut1). Le contrôle (cont) indique le pourcentage de P-bodies maintenus après inhibition de l'expression de DDX6, et avant la complémentation avec les différents plasmides cités précédemment.

4.1. Assemblage des P-bodies *de novo* dans les cellules HeLa

En introduction, nous avons vu que la protéine DDX6 était nécessaire à l'assemblage des P-bodies après traitement à l'arsenite, contrairement aux autres protéines testées dans ces études (Minshall et al., 2009; Serman et al., 2007). Nous avons donc voulu savoir si les partenaires protéiques de DDX6 testés ci-dessus étaient également indispensables à l'assemblage des P-bodies après traitement à l'arsenite. Les cellules HeLa ont été transfectées avec des siARNs dirigés contre DDX6 et certains de ses partenaires protéiques, puis traitées à l'arsenite pendant 30 minutes pour induire l'assemblage des P-bodies.

Après traitement à l'arsenite dans les cellules contrôles comme dans les cellules dans lesquelles l'expression d'EDC3 est inhibée, le nombre de P-bodies est multiplié par deux (**Figure 5B** en annexe et **R20, figures 6A** en annexe 1 et **R22**). Cette observation indique qu'EDC3 n'est pas nécessaire à l'assemblage de nouveaux P-bodies. Même si l'inhibition de l'expression de PAT1B entraîne une diminution du nombre de P-bodies, le stress induit par le traitement à l'arsenite dans les cellules déplétées pour PAT1B entraîne la même augmentation du nombre de P-bodies que dans les cellules contrôles. Ce résultat montre que PAT1B

participe au maintien des P-bodies dans les cellules non traitées, mais n'est pas indispensable à leur assemblage après traitement à l'arsenite.

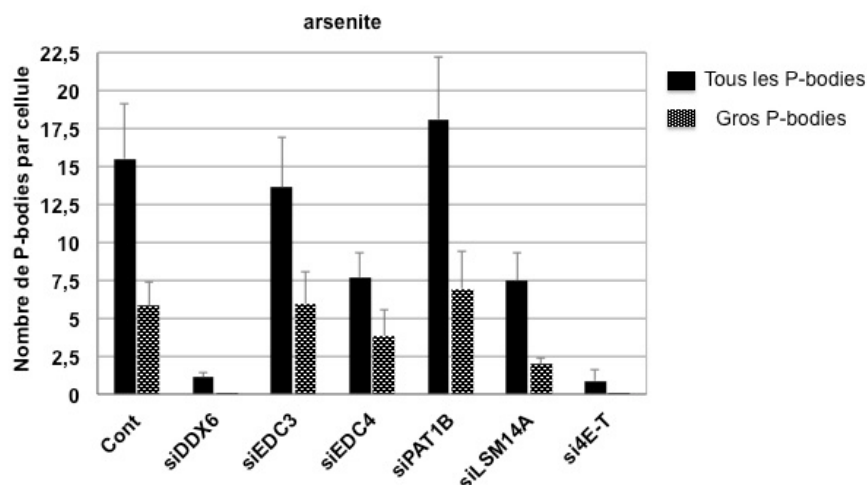


Figure R 22 : Rôle des protéines localisées dans les P-bodies dans leur assemblage après traitement des cellules à l'arsenite

Des cellules HeLa ont été transfectées avec des siARN dirigés avec les protéines indiquées en abscisse. 48h après, les cellules ont été traitées 30 minutes à l'arsenite avant d'être fixées et les P-bodies comptés. Un deuxième comptage ne prenant en compte que les « gros P-bodies » (>450 nm) a été réalisé pour mettre en évidence la caractéristique des P-bodies assemblés après inhibition d'expression de la protéine LSM14A

De plus, la déplétion d'EDC4 ou de LSM14A n'inhibe que partiellement l'assemblage des P-bodies après traitement à l'arsenite. Cependant, les P-bodies qui s'assemblent dans les cellules déplétées pour LSM14A sont de plus petite taille en comparaison avec les cellules contrôle, et contrairement à ceux qui s'assemblent en l'absence d'EDC4 dont la taille reste inchangée (**Figure R22**). Enfin, la déplétion de 4E-T inhibe l'assemblage des P-bodies après traitement à l'arsenite, de la même façon que DDX6.

En conclusion, ces observations montrent que les protéines DDX6, 4E-T, et dans une moindre mesure LSM14A sont nécessaires pour l'assemblage de nouveaux P-bodies dans les cellules HeLa après traitement à l'arsenite.

4.2. Etude de l'influence de DDX6, 4E-T et LSM14A sur l'assemblage des P-bodies dans différentes conditions de stress

Si la façon dont le traitement à l'arsenite induit l'assemblage des P-bodies n'est pas claire, une hypothèse est que cette drogue bloquerait la traduction des ARNm, générant un stock important d'ARNm réprimés, ce qui pourrait expliquer l'induction des P-bodies dans ces cellules en réponse à ce traitement. Pour savoir si les protéines DDX6, 4E-T et LSM14A sont impliquées dans l'assemblage des P-bodies de façon plus générale, différents traitements induisant l'assemblage des P-bodies ont été testés sur des cellules déplétées pour ces protéines. Le traitement des cellules à la vinblastine pendant une heure inhibe la polymérisation de la tubuline en microtubule et induit l'assemblage des P-bodies (Aizer et al., 2008). Nous avons également remarqué qu'un choc thermique à 30°C pendant 2 heures induisait l'assemblage des P-bodies (**Figure 7A**, publication en **annexe 1**).

Dans un premier temps, les effets de ces 3 traitements sur la traduction ont été comparés dans les cellules HeLa, sur gradients de polysomes (**Figure R23**). Si le traitement à l'arsenite inhibe la formation des polyribosomes, le traitement des cellules HeLa à la vinblastine et le choc thermique à 30°C n'ont qu'un léger effet sur l'accumulation des polysomes comme cela avait été montré dans la littérature sur gradients de sucrose (Carbonaro et al., 2011; Dresios et al., 2005).

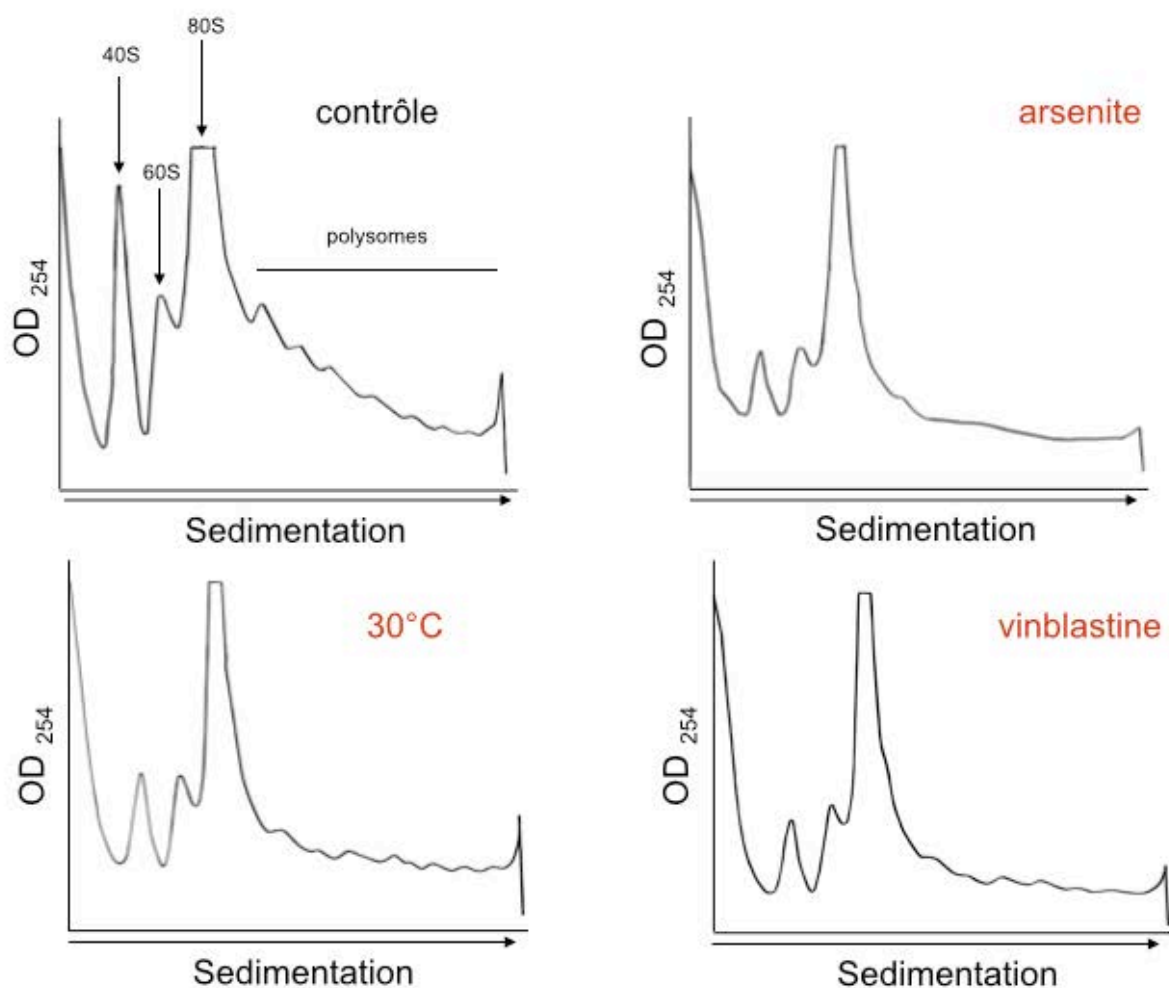


Figure R23 : Comparaison de l'effet des 2 drogues et du choc thermique sur la traduction, dans les cellules HeLa

Des lysats cytoplasmiques de cellules HeLa ont été séparés sur gradients de sucrose. La densité optique à 254 nm a été mesurée.

Les expériences d'inhibition de l'expression de certains des partenaires protéines de DDX6 décrites dans les parties 3.1 et 3.2 ont été répétées, puis les cellules ont été traitées à la vinblastine ou incubées à 30°C. Dans ces conditions DDX6, 4E-T et LSM14A sont nécessaires à l'assemblage de nouveaux P-bodies (**Figure 8**, publication en **annexe 1**). En réponse à la vinblastine, EDC4 facilite l'assemblage des P-bodies alors que PAT1B n'est pas nécessaire à leur assemblage. Enfin, lorsque les cellules sont incubées à 30°C, EDC4 et PAT1B facilitent l'assemblage des P-bodies.

En conclusion, DDX6 et 4E-T sont indispensables à l'assemblage des P-bodies dans l'ensemble des conditions testées. LSM14A est également nécessaire après traitement à la vinblastine ou après induction à 30°C. Les protéines impliquées dans le complexe de répression de la traduction des ARNm ont donc un rôle majeur dans l'assemblage des P-bodies.

Au contraire, EDC3 n'a pas d'effet sur le maintien des granules dans les cellules HeLa, et EDC4 a un effet mineur sur l'assemblage de nouveaux P-bodies. Concernant PAT1B, son influence sur l'assemblage des P-bodies dépend du stress induit dans les cellules : aucun effet sur l'assemblage des P-bodies n'est observé après traitement à l'arsenite ou à la vinblastine. Un effet mineur est observé après choc thermique.

5. Analyse des partenaires protéiques de DDX6 dans des cellules bloquées en mitose et dépourvues de P-bodies

La taille et le nombre de P-bodies pouvait varier au cours du cycle cellulaire (voir en introduction). En effet, si leur taille est réduite en phases G1 et S précoce, ils sont absents en mitose. Nous avons donc voulu savoir si des différences dans les partenaires de DDX6 pouvaient être observées lorsque les P-bodies n'étaient plus assemblés dans les cellules HEK293, en phase mitotique. Une hypothèse était qu'un des complexes majoritaires impliquant DDX6 aurait pu disparaître, ou bien qu'un complexe minoritaire voire absent lors de la première analyse aurait pu devenir majoritaire.

5.1. Stratégie expérimentale

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA. Après 48h, elles ont été bloquées en phase G1/S par ajout de thymidine dans le milieu de culture, pendant 16h. La culture a ensuite été poursuivie en milieu de culture sans drogue, permettant aux cellules d'être synchronisées en phase S. Enfin, par addition de nocodazole au milieu de culture (un agent antimitotique qui dépolymérise les microtubules), les cellules ont été bloquées en prométaphase. Parallèlement, une culture de cellules transfectées avec le même plasmide mais non traitées (asynchrones) a été réalisée comme contrôle de l'expérience.

Les échantillons de cellules bloquées en mitose ou asynchrones ont tous été traités à l'inhibiteur de RNases pour garder l'ensemble des protéines interagissant avec DDX6. Les quantités de matériel préparées pour cette expérience sont les suivantes :

- 20 flacons T150 de cellules transfectées avec le plasmide FLAG-DDX6-HA bloquées en mitose ont été culottés, estimant qu'avec le traitement nocodazole, nous ne récupérons que 20% de cellules efficacement transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA et bloquées en mitose.
- 4 boîtes de 15 cm de cellules transfectées avec le plasmide codant pour la protéine FLAG-DDX6-HA et asynchrones.
- 4 boîtes de 15 cm de cellules HEK293 transfectées avec un plasmide vide (pcDNA-FLAG) et asynchrones.

Les complexes contenant la protéine DDX6 ont été purifiés par l'approche expérimentale de TAP-tag décrite précédemment.

Contrôle de l'efficacité du traitement thymidine / nocodazole

Une fraction des échantillons a été mise en présence d'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN, et analysée en cytométrie de flux pour contrôler le blocage des cellules en mitose (**Figure R24**).

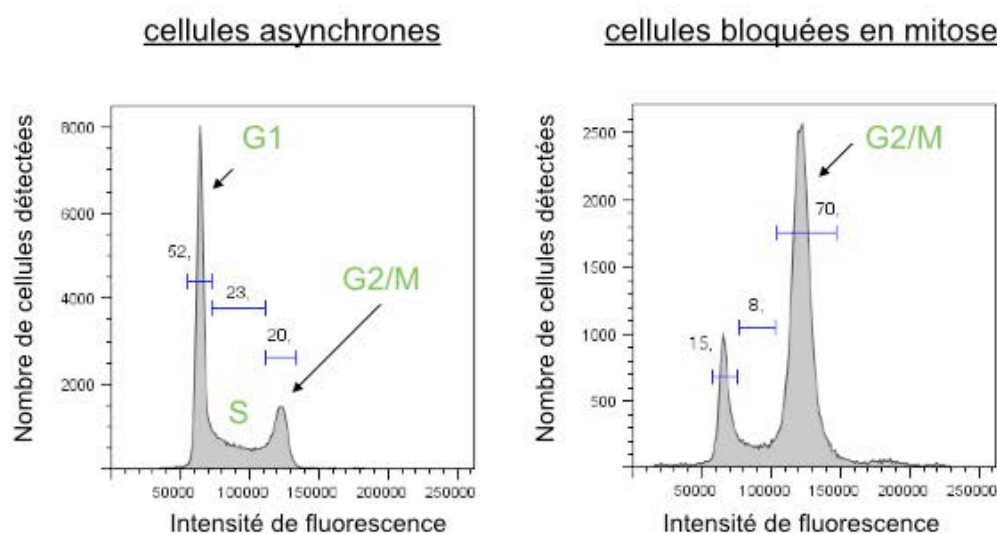


Figure R 24 : Contrôle du blocage des cellules en mitose, par cytométrie de flux

20% des cellules sont en phase G2/M dans l'échantillon asynchrone, contre 70% dans l'échantillon traité. Le traitement thymidine / nocodazole a donc été efficace, et la majorité des cellules sont bloquées en phase G2/M.

Contrôle de la qualité de purification et envoi des échantillons en spectrométrie de masse

Comme pour la première analyse, un dixième des extraits purifiés a été analysé sur gel coloré au nitrate d'argent pour contrôler la qualité de la purification (**Figure R25A**). Les neuf dixièmes restants ont été analysés en spectrométrie de masse à la plateforme de protéomique de Cambridge comme précédemment (**Figure R25B**).

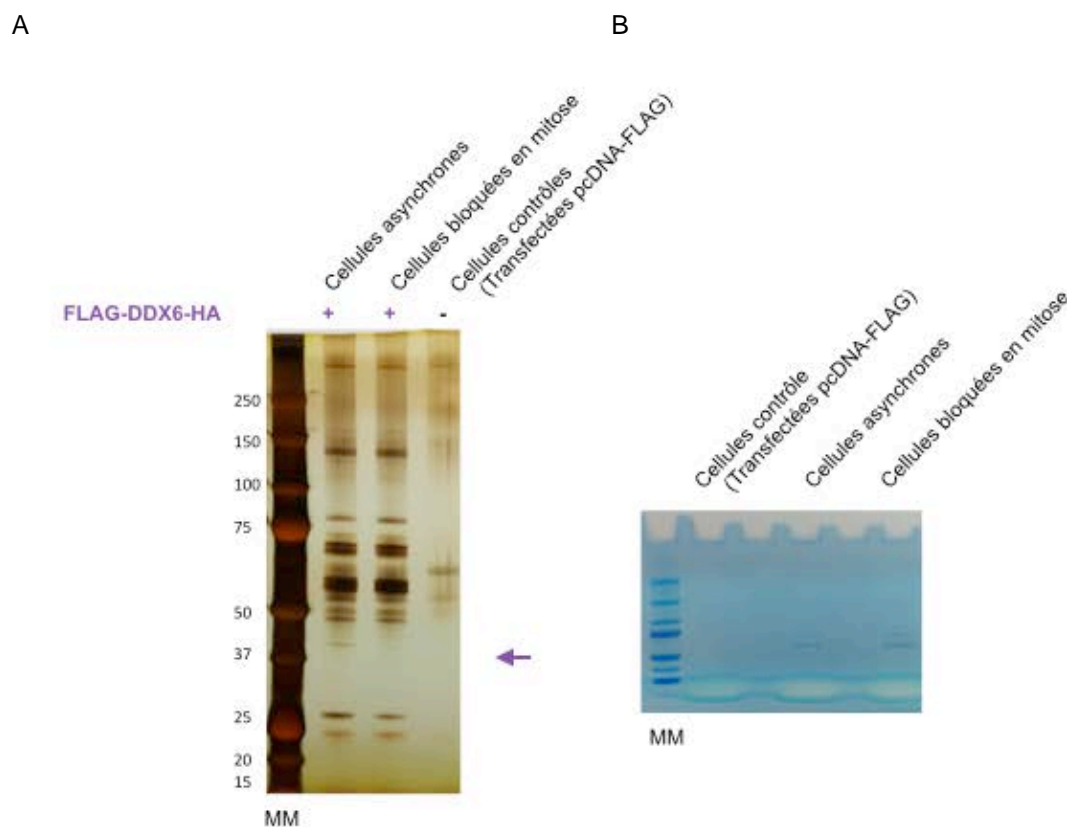


Figure R25 : Analyse de la qualité de purification et préparation des échantillons pour l'envoi en spectrométrie de masse

A. Un dixième des éluats déposé sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent pour contrôler la qualité de la purification. **B.** Neuf dixièmes des éluats déposés sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie pour envoi en spectrométrie de masse.

En comparaison avec la première expérience de spectrométrie de masse, nous estimons que la quantité analysée dans cette deuxième expérience est 3 fois moins importante. De ce fait, la comparaison entre les deux analyses est difficile à réaliser. Alors que les partenaires majoritaires de DDX6 devraient être retrouvés dans cette analyse, au moins dans l'échantillon asynchrone, les partenaires minoritaires de DDX6, ceux qui ont été identifiés avec de faibles scores dans la première analyse, seront probablement absents.

5.2. Résultats de la spectrométrie de masse

Sans tenir compte des 45 protéines identifiées dans l'échantillon contrôle, 195 partenaires protéiques de DDX6 ont été identifiés dans l'échantillon dans lequel les cellules étaient bloquées en mitose et 205 dans l'échantillon de cellules asynchrones.

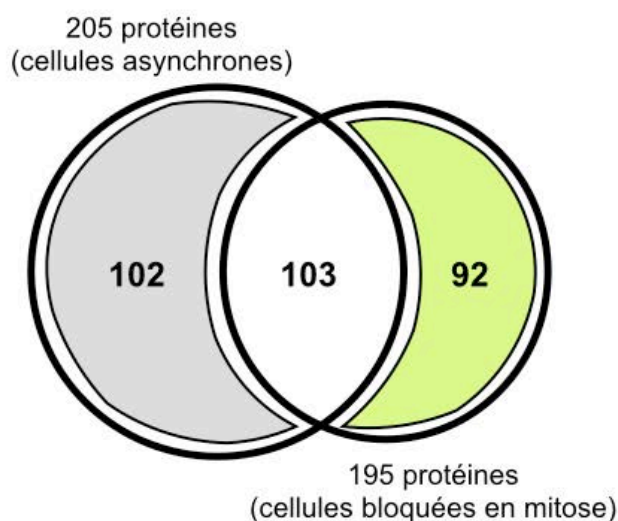


Figure R 26 : Résultats de la deuxième spectrométrie de masse (MS2), à partir de cellules HEK293 bloquées en mitose

103 protéines sont identifiées dans les deux échantillons, et sont donc en interaction avec DDX6 indépendamment du cycle cellulaire. 92 protéines sont identifiées exclusivement dans les cellules bloquées en mitose. 102 protéines sont identifiées seulement dans les cellules asynchrones (**Figure R26**). En mitose, les scores vont de 2315 à 36, et de 2283 à 36 dans l'échantillon de cellules asynchrones. En termes de scores, il n'y a pas une grande différence avec la première spectrométrie de masse (RNase out max : 2435, min : 29 ; RNase A max : 3230, min : 29). C'est le nombre de protéines identifiées par rapport à la quantité de matériel analysé qui change entre les deux analyses.

Les 20 protéines identifiées avec les meilleurs scores dans les deux échantillons sont indiquées dans un tableau en **annexe 3**.

5.3. Analyse qualitative des résultats de spectrométrie de masse

Pour donner un aperçu général des résultats de cette analyse, les fonctions des protéines identifiées dans l'échantillon asynchrone ont été annotées manuellement d'après les données de la littérature et analysées sur le site « Gene ontology » (GO) comme pour la première expérience (**Figures R27 A, B et C**). Les protéines liées au métabolisme de l'ARN sont toujours majoritaires dans les hauts et moyens scores dans l'échantillon asynchrone (**Figure R27A**). La quantité de protéines du cytosquelette et liées au métabolisme de la mitochondrie reste faible, témoignant de la qualité de la purification des complexes. L'analyse des protéines sur GO montre à nouveau un fort enrichissement en protéines impliquées dans le métabolisme de l'ARN (**Figure R27B**). Enfin, Les protéines impliquées dans la dégradation et la répression des ARNm, ainsi que les protéines du ribosome sont toujours majoritaires parmi les protéines liées au métabolisme de l'ARNm (**Figure R27C**).

5.3.1. Comparaison des échantillons de cellules mitotiques et asynchrones

Les protéines identifiées dans les cellules bloquées en mitose ont été annotées manuellement et analysées sur GO de la même façon que les échantillons de cellules asynchrones. Globalement, aucun changement en terme de grande fonction n'est détecté en comparaison avec l'échantillon de cellules asynchrones (**Figures 27 A, B et C**). Une majorité de protéines sont impliquées dans le métabolisme de l'ARNm. Parmi ces dernières, les protéines de répression et de dégradation des ARNm sont majoritaires.

Lorsqu'on s'intéresse aux complexes protéiques majoritaires impliquant DDX6 qui ont été mis en évidence dans notre première expérience de purification, tous sont identifiés dans cette expérience dans les échantillons des cellules asynchrones et mitotiques. En effet, les protéines EDC3, DCP1A et DCP1B du complexe de décoiffage sont retrouvées dans les deux échantillons, parmi les 20 partenaires ayant les meilleurs scores (**Figure R28**). Dans le reste des listes sont également identifiées EDC4 et XRN1. D'autre part, les protéines LSM14A et LSM14B ainsi que 4E-T et PAT1B du complexe de répression de la traduction des ARNm sont parmi les 20 meilleurs scores, dans les deux échantillons. Enfin, les ATXN2L

et ATXN2 ainsi que les PABPC1, PABPC4, G3BP1, G3BP2 et LSM12 sont également identifiés dans les deux échantillons parmi les 20 meilleurs scores. ATXN2L a le meilleur score dans cette analyse. Les protéines G3BP1, G3BP2 et LSM12 sont identifiées plus bas dans la liste.

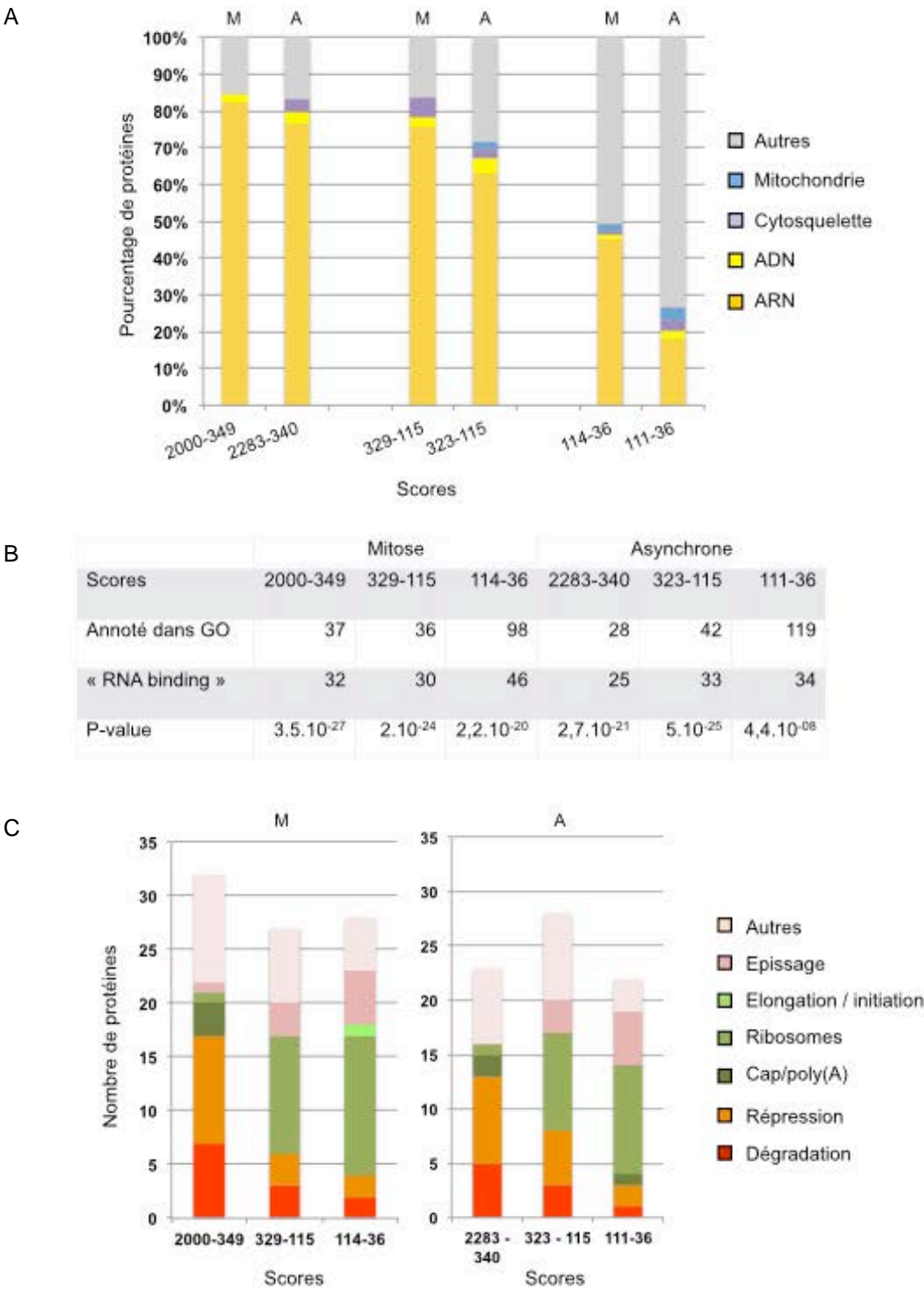


Figure R27 : Annotation manuelle et analyse GO des protéines identifiées en spectrométrie de masse

	MS2	Mitose	Asynchrone	
N M D	Dégradation 5'-3'			
	EDC3	2052	2064	TOP
	DCP1A	1732	1723	
	DCP1B	1566	1715	
	EDC4	481	294	
	XRN1	195	74	
	XRN2	-	-	
	LSM1-7	-	-	
	Dégradation 3'-5'			
	exosome	-	-	
N M D	CCR4-	-	-	
	UPF1	1580	1304	TOP
	DDX17	123	-	
	DDX5	114	-	
	SMG6	-	-	
A T A X I N	Répression			
	LSM14B	1570	1393	TOP
	4E-T	1075	868	
	LSM14A	1072	1176	
	PAT1B	862	811	
	eIF4E1	-	-	
	eIF4E2	-	-	
	CPEB1	-	-	
	RNAi			
	MOV10	712	245	
A T A X I N	Autres			
	ATXN2L	2315	2283	TOP 1
	PABPC1	2137	2142	TOP
	PABPC4	1972	1839	
	ATXN2	1558	1570	
	LSM12	243	246	
	G3BP2	834	744	
	G3BP1	424	228	

Figure R 28 : Tableau de score des partenaires majoritaires de DDX6 identifiées dans la deuxième spectrométrie de masse

Parmi les 96 protéines identifiées uniquement dans l'échantillon de cellules en mitose, seulement 12 protéines répertoriées dans le tableau ci-dessous ont un score supérieur à 115 (**Figure R29**). Parmi celles-ci se trouvent des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN, de l'ARN et des protéines du cytosquelette.

Protéines	Cellules bloquées en mitose (scores MS2)	Cellules asynchrones (scores MS2)	Scores MS1 (inhibiteur RNses ; RNase)	Fonction associée
HIST1H4H	467	-	-	Nucléosome
RPS3A	315	-	837 ; 91	Protéine S3 de la sous-unité 40S du Ribosome
COL1A1	293	-	-	Collagène
ANXA1	208	-	-	Fusion des membranes et
FXR2	176	-	618 ; -	répression de la traduction
FMR1	166	-	432 ; -	répression de la traduction
NEFH	159	-	91 ; -	Cytosquelette (neurofilament)
YTHDC2	139	-	1611 ; 29	Epissage et stabilité des ARNm
ELAVL2	137	-	252 ; -	Ribonucléoprotéine
SYNCRIP	123	-	667 , -	dégradation des ARNm
DDX17	123	-	480 ; 72	Hélicase impliquée dans le NMD
DKFZp781L0540	115	-	-	non caractérisée

Figure R 29 : Protéines identifiées uniquement dans l'échantillon des cellules bloquées en mitose (MS2)

La majorité de ces protéines sont identifiées également dans notre première analyse de spectrométrie de masse. Ainsi, même si elles ne sont pas identifiées dans l'échantillon de cellules asynchrones, elles ne sont pas pour autant spécifiques des cellules bloquées en mitose.

Parmi les 102 protéines identifiées dans l'échantillon des cellules asynchrones mais pas dans l'échantillon des cellules bloquées en mitose, 10 seulement ont un score supérieur à 115, et la majorité avait été identifiée dans la première analyse de spectrométrie de masse (**Figure R30**).

Protéines	Cellules asynchrones (scores MS2)	Cellules bloquées en mitose (scores MS2)	Scores MS1 (inhibiteur RNses ; RNase)	Fonction associée
HEL113	1258	-	-	Epididymis luminal protein 113
ACTB	750	-	333 ; 461	cytosquelette
HIST1H4A	522	-	256 ; 308	chromatine
PABPC1L	428	-	-	Poly(A) binding protein-1-like
ILF3	268	-	1314 ; -	répression de la traduction
HNRNPF	199	-	554 ; 321	hnRNP
EIF4A2	199	-	71 ; 191	traduction
PRSS1	168	-	-	non caractérisée
EEF1A1	161	-	-	Elongation factor 1-alpha 1
H2AFZ	118	-	- ; 163	chromatine

Figure R 30 : Protéines identifiées uniquement dans l'échantillon de cellules asynchrones

En conclusion, la dissociation des P-bodies dans les cellules HEK293 bloquées en mitose n'entraîne pas de changement majeur des partenaires protéiques majoritaires de DDX6. Les complexes majoritaires impliquant DDX6 sont présents dans les cellules HEK293, indépendamment de la présence de P-bodies.

5.3.2. Comparaison des deux expériences de purification des complexes contenant DDX6

Contrairement à la première analyse de spectrométrie de masse, les protéines du complexe LSM1-7, l'exonucléase XRN2, ainsi que les protéines eIF4E1, eIF4E2 et les protéines du cœur de l'EJC sont absentes de cette analyse. Dans la première analyse de

spectrométrie de masse, elles avaient toutes de bas scores. Or, comme nous l'avons précédemment précisé, cette deuxième expérience de purification a été réalisée avec 3 fois moins de matériel. Une hypothèse est donc que les protéines identifiées avec de bas scores dans l'expérience précédente dans laquelle il y avait 3 fois plus de matériel biologique, se retrouvent cette fois-ci sous le seuil de détection. Une autre hypothèse est que l'interaction entre DDX6 et les partenaires absents de cette analyse a été perdue durant la purification.

Discussion et perspectives

Même si un grand nombre d'informations convergent vers l'hypothèse que les P-bodies sont des sites actifs de stockage et de dégradation des ARNm, ni le stockage des ARNm chez la levure et les mammifères, ni la dégradation des ARNm chez la levure ne semblent perturbés lorsque les P-bodies sont supprimés expérimentalement (Balagopal and Parker, 2009). Leur fonction reste encore énigmatique.

Conservés au cours de l'évolution, leur structure et leur composition en mRNPs est étudiée depuis une quinzaine d'année par différentes approches de microscopie dans divers organismes. Néanmoins, l'étude de leur composition n'est pas simple, puisque aucun protocole de purification des P-bodies n'a encore été mis au point. Les différentes études portant sur ce sujet se sont donc intéressées à comprendre l'influence que pouvaient avoir certaines protéines localisées dans les P-bodies sur le maintien de ces granules. Dans les cellules de mammifères, l'inhibition d'expression des protéines GW182, LSM1, DDX6, 4E-T, EDC4, LSM14A, CPEB1 ou PAT1B mène à la diminution du nombre de P-bodies voire à leur disparition, suggérant que ces protéines sont nécessaires à leur assemblage (Andrei et al., 2005; Marnef et al., 2010; Ozgur et al., 2010; Wilczynska et al., 2005; Yang et al., 2006, 2004; Yu et al., 2005).

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a montré qu'en induisant un stress cellulaire en incubant les cellules avec de l'arsenite, les P-bodies s'assemblaient à nouveau dans les cellules déplétées pour GW182 et CPEB1, suggérant un mécanisme d'assemblage sous-jacent plus complexe que ce qui avait été précédemment décrit (Serman et al., 2007). De façon intéressante, l'équipe a également montré que les P-bodies ne s'assemblaient pas après incubation avec de l'arsenite dans les cellules déplétées pour DDX6. Suggérant que DDX6 était nécessaire à l'assemblage des P-bodies, son étude représentait donc un bon point de départ pour comprendre d'avantage le mode d'assemblage et la fonction de ces granules dans les cellules humaines.

Comme nous l'avons vu en introduction, des alignements de séquences ont permis de montrer que DDX6 appartient à la famille des hélicases à motif DEAD, et qu'elle est conservée au cours de l'évolution, de la levure à l'homme, suggérant qu'elle assure une fonction importante chez les eucaryotes. De plus, l'abondance de DDX6 a été estimée dans

les cellules humaines, chez le trypanosome et le xénope (Ernault-Lange et al., 2012; Kramer et al., 2010; Smillie and Sommerville, 2002). Toutes ces données montrent que la protéine DDX6 est très abondante dans ces organismes. Enfin, l'hélicase est impliquée dans une large variété de fonctions en rapport avec le métabolisme de l'ARNm comme le montre la littérature dans une large variété d'organismes. En effet, par ses interactions avec certaines protéines, DDX6 est impliquée dans des complexes de répression et de dégradation des ARNm, ainsi que dans l'ARN interférence.

Au vu de ces données, nous avons voulu savoir quelle(s) fonction(s) avait la protéine dans les cellules humaines. Nous avons donc choisi de faire une purification en tandem (TAP-tag) des complexes mRNP contenant la protéine FLAG-DDX6-HA à partir de cellules épithéliales humaines HEK293 en culture, et de les identifier en spectrométrie de masse. Les données ci-dessus énoncées nous ont conduit à faire plusieurs hypothèses préliminaires en amont de cette expérience. En termes d'interaction d'une part, étant donnée son abondance dans la cellule humaine, DDX6 serait en interaction avec une grande quantité de protéines dans les cellules humaines. Nos résultats ont confirmé cette hypothèse puisque l'analyse de spectrométrie de masse nous a permis d'identifier plus de 300 protéines interagissant avec DDX6. En terme de fonctions d'autre part, une possibilité était qu'une grande partie des fonctions voire la totalité des fonctions décrites dans différents organismes serait retrouvée à travers les partenaires protéiques identifiés. Une autre possibilité encore, était que dans les cellules humaines, DDX6 serait majoritairement impliquée dans un nombre restreint de fonctions bien précises.

Parmi toutes ces fonctions, notre expérience a permis de mettre en évidence 3 complexes principaux dans lesquels DDX6 est impliquée dans les cellules humaines : le complexe de décoiffage et de dégradation 5'-3' des ARNm, un complexe de répression « CPEB-like » de la traduction des ARNm, et un complexe cytoplasmique composé des protéines ATXN2 et ATXN2L impliquées dans diverses fonctions. Nous avons également mis en évidence la présence des protéines du cœur de l'EJC, et d'un grand nombre de protéines ribosomales. Enfin, certains complexes décrits dans la littérature n'ont pas été identifiés dans nos échantillons. Revenons sur ces résultats.

DDX6 est impliquée dans le complexe de décoiffage et de dégradation 5'-3' des ARNm

Tous les composants connus du complexe de décoiffage sont identifiés comme partenaires protéiques de DDX6 (EDC4, EDC3, DCP1A, DCP1B, DCP2, LSM1, LSM2, LSM3, LSM4, LSM6 et LSM7, XRN1, XRN2). Les expériences d'immunoprécipitation avec la protéine DDX6 endogène dans des cellules HEK293 non transfectées ont confirmé les interactions entre DDX6 et EDC3, EDC4, DCP1A et XRN1, en présence et en absence d'ARNm (**Figure D1**). Comme nous l'avons vu, une large fraction des protéines EDC3 et DCP1A est associée à DDX6 dans les cellules humaines, suggérant que DDX6 est un partenaire protéique principal de EDC3 et DCP1A.

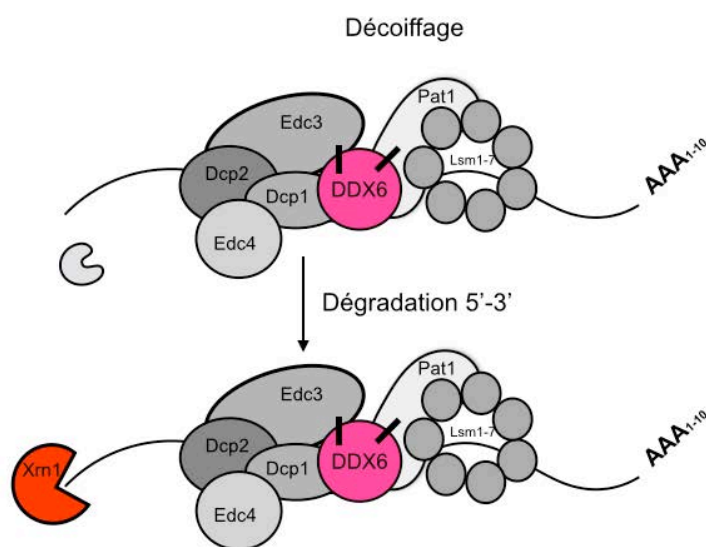


Figure D 1 : DDX6 est impliquée dans les complexes de décoiffage et de dégradation 5'-3' des ARNm, dans les cellules humaines

En accord avec la littérature existante chez différentes espèces, nos expériences d'immunofluorescence montrent que EDC3, EDC4, DCP1A et XRN1 sont enrichies dans les p-bodies, dans les cellules humaines. Les complexes de décoiffage et de dégradation 5'-3' des ARNm contenant DDX6 peuvent donc être localisés dans le cytoplasme et dans les P-bodies.

Une question a été traitée parallèlement au laboratoire par Marianne Bénard, concernant le rôle de ces partenaires sur le maintien et l'assemblage des P-bodies. Parmi ces protéines, seule EDC4 facilite mais n'est pas nécessaire à l'assemblage des P-bodies. Les

protéines du complexe de dégradation des ARNm ne semblent donc pas participer à l'assemblage de ces granules dans la cellule humaine.

DDX6 est impliquée dans un complexe de répression de la traduction « CPEB-like »

Les protéines PAT1B, 4E-T, LSM14A et LSM14B du complexe de répression de la traduction des ARNm sont identifiées comme partenaires principaux de DDX6 et eIF4E1 ainsi que eIF4E2 sont identifiées avec de plus petits scores. De plus, nos expériences de coprécipitation confirment ces interactions *in vivo* et indiquent également qu'elles sont toutes partiellement dépendantes de l'ARNm et qu'une large fraction de 4E-T interagit avec DDX6 (**Figure D2**). Ces résultats sont en accord avec la littérature existante dans les ovocytes de xénope, au sein desquels DDX6 fait partie d'un large complexe de répression de la traduction des ARNm, le complexe CPEB (Minshal et al., 2001).

Néanmoins, la protéine CPEB1 se liant aux séquences CPE portées par les ARNm ciblés chez le xénope n'est pas identifiée comme partenaire protéique de DDX6 dans les cellules HEK293. Une explication simple serait que la protéine CPEB1 est trop faiblement exprimée pour être détectée dans les cellules humaines, comme le montrent une analyse de protéome haut débit menée récemment dans les cellules HeLa dans lesquelles CPEB1 n'est pas détectée, ainsi que l'étude menée par le laboratoire dans les cellules HeLa dans laquelle CPEB1 est faiblement détectée en western blot (Ernault-Lange et al., 2009; Nagaraj et al., 2014). Une autre hypothèse serait que la protéine CPEB1 pourrait être remplacée par une protéine s'ancrant à l'ARNm *via* les mêmes séquences CPE ou *via* d'autres séquences permettant la régulation de la traduction des ARNm. Un modèle de ce type a été proposé chez le xénope au cours du développement des axones de la rétine (Lin et al., 2009). Même si la protéine CPEB1 n'est pas détectée dans les cellules ganglionnaires de la rétine, la polyadénylation cytoplasmique et la régulation de la traduction *via* les motifs CPE portés par certains ARNm sont des régulations nécessaires au développement des axones de la rétine. Dans ces cellules, ces deux processus ont donc lieu en l'absence de la protéine CPEB1. Cette étude montre qu'une ou plusieurs protéines se liant aux sites CPE peuvent exercer le même type de régulation en l'absence de CPEB1.

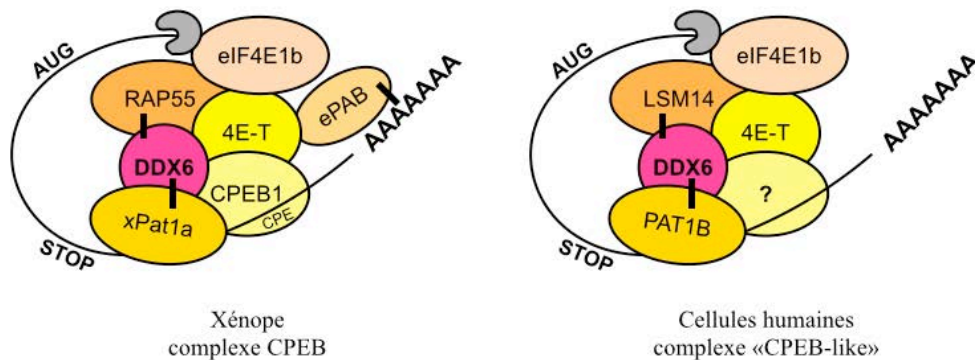


Figure D 2 : DDX6 est impliquée dans un complexe de répression de la traduction "CPEB-like", dans les cellules humaines

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées en parallèle pour connaître la localisation subcellulaire de ces protéines dans les cellules humaines. En accord avec la littérature, 4E-T, PAT1B, LSM14A et LSM14B sont toutes enrichies dans les P-bodies, suggérant que le complexe de répression « CPEB-like » peut être présent dans le cytoplasme comme dans les P-bodies. eIF4E est faiblement enrichie dans les P-bodies, en accord avec sa fonction d'activateur de l'initiation de la traduction.

Parmi ces protéines, 4E-T est indispensable à l'assemblage des P-bodies, et LSM14A est également nécessaire en conditions de stress induit par un traitement à la vinblastine ou une incubation à 30°C. Les protéines impliquées dans la traduction ont donc un rôle majeur dans l'assemblage des P-bodies dans les cellules humaines.

Les complexes de répression et de dégradation des ARNm s'assemblent-ils de façon exclusive sur les ARNm ciblés ?

DDX6 est donc impliqué majoritairement dans ces complexes de répression et de dégradation des ARNm. Comme nous l'avons vu en introduction, les protéines LSM14A, EDC3 et PAT1B interagissent avec DDX6 *via* un même site au niveau d'une poche d'interaction reconnaissant le motif FDF de LSM14A et EDC3, et le motif DW de PAT1B (Sharif et al., 2013; Tritschler et al., 2009).

Ces données de cristallographie convergent vers l'hypothèse que ces protéines ne peuvent pas se lier simultanément à DDX6. Or, nous avons vu que DDX6 peut s'oligomériser

(Ernoul-Lange et al., 2012). Une hypothèse est donc que ces protéines pourraient interagir simultanément avec un oligomère DDX6, permettant de façon plus générale l'interaction simultanée des complexes de répression et de dégradation des ARNm avec DDX6. L'équipe a également montré que plusieurs molécules de DDX6 pouvaient se lier à une molécule d'ARNm réprimée dans l'ovocyte de xénope (Ernoul-Lange et al., 2012). Dans ce modèle, DDX6 peut donc recruter indépendamment mais de façon simultanée les complexes de dégradation ou de répression des ARNm sur une seule molécule d'ARNm.

Pour compléter le modèle de répression de la traduction impliquant DDX6 proposé en 2012, le complexe de répression « CPEB-like » viendrait se lier à un ARNm en cours de traduction dans le cytoplasme, pour inhiber sa traduction. La liaison d'un complexe « CPEB-like » à l'ARNm entraînerait la liaison de plusieurs molécules de DDX6 le long de l'ARNm régulé. Ces molécules de DDX6 permettraient au complexe de dégradation de se lier de façon simultanée au même ARNm. Les ARNm pourraient ainsi être dégradés dans le cytoplasme (**Figure D3**).

Les ARNm adoptent également une conformation relâchée en présence d'ATP (Ernoul-Lange et al., 2012), et s'accumulent dans les P-bodies. Les ARNm ainsi stockés dans les P-bodies pourraient alors y être dégradés, ou être libérés des P-bodies pour être à nouveau traduits dans le cytoplasme (**Figure D3**).

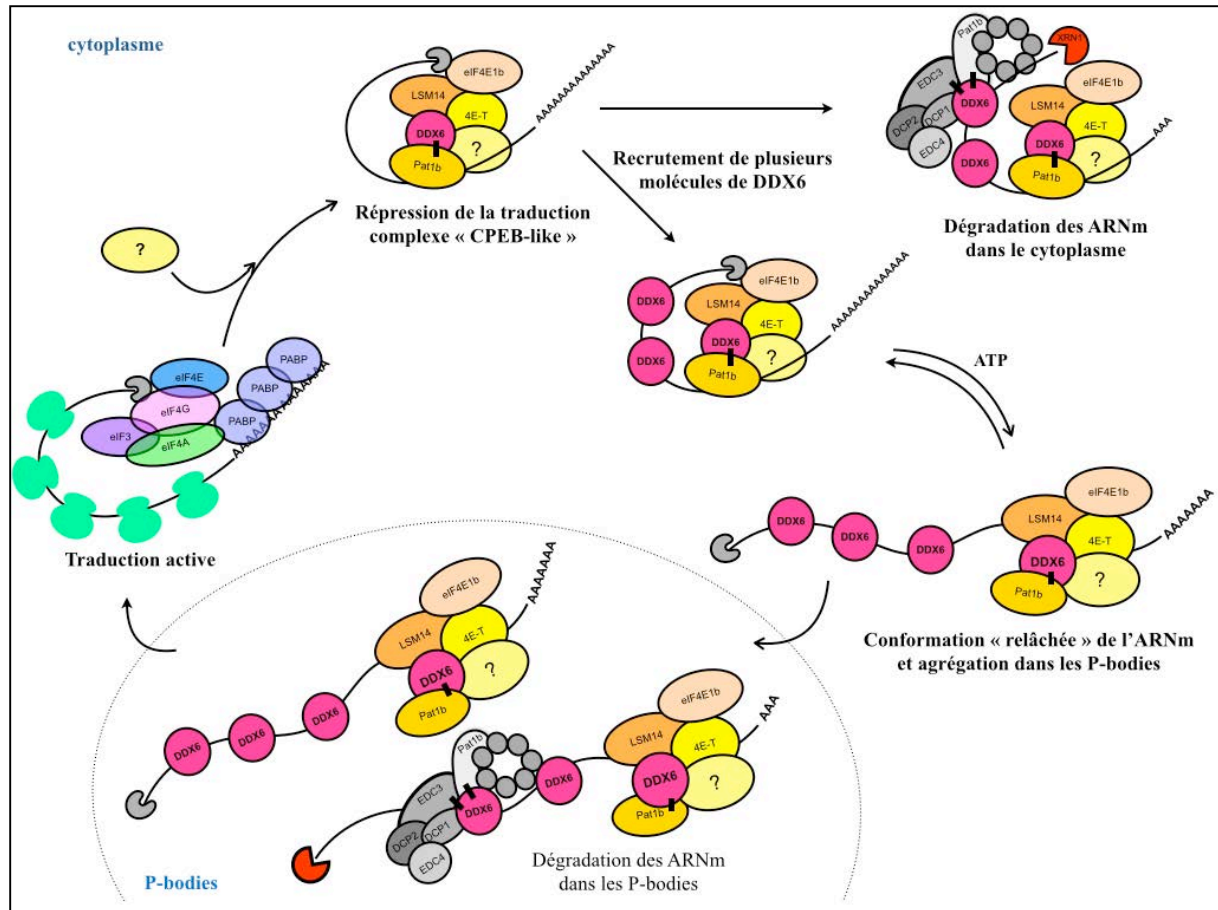


Figure D 3 : Modèle de fixation multiple de DDX6 permettant la liaison simultanée d'un complexe de répression "CPEB-like" et du complexe de dégradation 5'-3 des ARNm

DDX6 est impliquée dans un complexe cytoplasmique composé des protéines ATXN2 et ATXN2L

De façon surprenante, les ATXN2 et ATXN2L sont identifiées parmi les partenaires protéiques principaux de DDX6 dans les cellules humaines. Si l'interaction entre DDX6 et les ataxines avait déjà été mise en évidence dans les cellules humaines (Nonhoff et al., 2007), l'abondance de ce complexe avait été sous-estimée, et la fonction biologique associée à cette interaction n'avait pas été exploitée.

En termes d'interactions, il a été montré que les ATXN2 et ATXN2L interagissent avec DDX6 *via* leurs domaines LSm et LSmAD (*LSm Associated Domain*). Ces domaines sont portés par ces deux protéines et partagent 80% d'identité de séquence (Albrecht et al., 2004; Figueroa and Pulst, 2003; Kaehler et al., 2012; Nonhoff et al., 2007). Dans les cellules de

mammifère, les ATXN2 et ATXN2L se lient directement à la PABPC1 *via* leur motif PAM2 (Kaehler et al., 2012; Kozlov et al., 2001; Mangus et al., 1998).

Dans notre expérience, PABPC1, PABPC4 et PABPC3 sont également identifiés comme partenaires protéiques de DDX6. D'autres partenaires des ataxines ont été identifiés comme partenaires de DDX6 : LSM12 qui interagit avec ATXN2, et G3BP qui interagit avec ATXN2 et ATXN2L dans les cellules HeLa (Kaehler et al., 2012; Swisher and Parker, 2010).

En termes de fonction, une étude montre que ATXN2 se lie spécifiquement à des ARNm pour les stabiliser. ATXN2 se lie directement, *via* son domaine LSm, à des séquences riches en uracile en 3'UTR des ARNm ciblés, pour promouvoir leur stabilité (Yokoshi et al., 2014). Chez la levure, l'homologue de ATXN2, PBP1, peut assurer l'un des rôles de la PABPC1 en inhibant l'accès de la nucléase PAN à la queue poly(A), empêchant ainsi la dégradation de l'ARNm (Mangus et al., 1998, 2004). ATXN2 est également impliquée dans l'activation de la traduction de la protéine PERIOD, qui régule le cycle circadien chez la drosophile (Lim and Allada, 2013). Paradoxalement, ATXN2 participe à la voie de répression par les miRNA *in vivo*, dans les cellules de drosophile (McCann et al., 2011).

Comme nous l'avons vu précédemment, nos expériences d'immunoprécipitation avec la protéine DDX6 endogène dans les cellules HEK293 non transfectées confirment ces interactions sauf pour G3BP (voir partie résultats). De plus, les ATXN2 et ATXN2L sont diffuses dans le cytoplasme en immunofluorescence. Ces résultats mettent donc en évidence l'existence d'un complexe cytoplasmique majeur impliquant DDX6, composé des protéines ATXN2, ATXN2L, PABP et LSM12, exclu des P-bodies et dont la fonction reste à clarifier (Kaehler et al., 2012; Nonhoff et al., 2007).

En condition de stress, les ATXN2 et ATXN2L sont recrutées dans les granules de stress, et l'inhibition partielle de l'expression de ATXN2 mène à une diminution du nombre de granules de stress dans les cellules humaines (Nonhoff et al., 2007). De façon intéressante, l'expression de la protéine ATXN2 peut également influencer l'assemblage des P-bodies. En effet, la surexpression de ATXN2 entraîne une diminution du nombre de P-bodies dans les cellules humaines (Nonhoff et al., 2007). De plus, cet effet a été observé en surexprimant soit l'ensemble de la protéine ATXN2, soit le domaine LSm de ATX2, région nécessaire à son interaction avec DDX6. Cette dernière observation suggère que la relocalisation de DDX6

dans les granules de stress pourrait être facilitée par le recrutement de DDX6 par ATXN2. La dissociation des P-bodies observée lors de la surexpression de ATXN2 pourrait donc être le résultat de la relocalisation de DDX6 dans les granules de stress *via* son interaction avec ATXN2.

Certaines protéines ne sont pas identifiées parmi les partenaires protéiques de DDX6 dans nos expériences de purification

Le complexe de dégradation CCR4-NOT n'est pas identifié dans cette analyse. Or, comme nous l'avons vu en introduction, l'interaction directe entre DDX6 et POP2 a été mise en évidence par des expériences de double hybride chez la levure (Coller et al., 2001; Hata et al., 1998), et l'interaction entre DDX6 et CNOT1 a été montrée par coprécipitation dans les cellules, et par cocristallisation chez la levure (Mathys et al., 2014; Rouya et al., 2014).

Plusieurs hypothèses sont possibles concernant l'absence de ces protéines dans nos analyses. D'une part, ces protéines ne seraient pas des partenaires de DDX6 assez abondants dans les cellules HEK293 pour être détectées en spectrométrie de masse, parmi les nombreux partenaires protéiques abondants identifiés dans cette expérience de purification. Une autre possibilité serait que ces interactions soient transitoires, les rendant indétectables dans notre analyse. Enfin, leur absence dans notre analyse pourrait être liée à la stratégie de purification utilisée.

Une fraction de DDX6 est associée aux polysomes

Puisque de nombreuses protéines ribosomales ont été identifiées avec de hauts scores dans notre analyse de spectrométrie de masse, nous avons voulu savoir si DDX6 pouvait interagir avec les polysomes dans les cellules humaines. Comme le montrent les expériences de gradients de sucrose, une petite fraction de DDX6 est effectivement localisée dans les polysomes. Lorsque les polysomes s'accumulent sur les ARNm par traitement des cellules à la cycloheximide, DDX6 s'accumule également dans les polysomes. DDX6 s'associe donc bien aux polysomes dans les cellules humaines, en accord avec les données existantes chez la levure (Drummond et al., 2011).

Pourquoi une protéine comme DDX6, impliquée dans la répression et la dégradation des ARNm, serait recrutée par des ARNm en cours de traduction ? Plusieurs possibilités peuvent être envisagées.

D'une part DDX6 pourrait réprimer la traduction des ARNm sous forme de polysomes. Un modèle a été proposé chez la levure, dans lequel DDX6 assure sa fonction de répression à un stade avancé de la traduction, en ralentissant le mouvement des ribosomes sur l'ARNm (Sweet et al., 2012). Une autre étude chez la drosophile, s'appuyant sur la protéine FMRP (qui s'associe aux polysomes et qui interagit avec DDX6) a aussi montré qu'elle exerçait sa fonction de répression en induisant le blocage des ribosomes sur les ARNm ciblés (Darnell et al., 2011). D'autre part, DDX6 pourrait assurer la dégradation co-translationnelle des ARNm, comme le suggèrent différentes études réalisées chez la levure. Un modèle propose que DDX6 pourrait en effet fonctionner comme un détecteur des ARNm sur lesquels l'élongation est ralentie (Presnyak et al., 2015; Sweet et al., 2012). Lorsqu'un ralentissement de l'élongation de la traduction est induit par la présence de codons rares dans la séquence codante d'un ARNm rapporteur, ces ARNm sont dégradés par l'intervention de DDX6. Des analyses complémentaires réalisées au sein de levure déplétées pour DDX6 montrent que l'aptitude des levures à dégrader les ARNm sur lesquels le mouvement des ribosomes est ralenti est diminuée en absence de DDX6.

Pour commencer à répondre à ces questions, nous avons voulu identifier les protéines impliquées dans la répression et la dégradation des ARNm, qui pouvaient en partie se localiser dans les polysomes comme DDX6. Si une fraction de LSM14A impliquée dans la répression de la traduction s'associe aux polysomes de la même façon que DDX6, ce n'est pas le cas du facteur de décoiffage EDC4. Cette observation serait donc plutôt en faveur de la première proposition, avec DDX6 s'associant aux polysomes pour faciliter la répression de la traduction des ARNm.

En perspective, il serait intéressant de savoir si les autres protéines du complexe de répression « CPEB1-like » peuvent s'associer aux polysomes dans les cellules humaines. Pour trancher entre les deux hypothèses ci-dessus proposées, il faudrait également vérifier la localisation d'autres protéines impliquées dans le complexe de dégradation des ARNm. Une autre analyse serait intéressante concernant l'influence de l'expression des protéines localisées dans les polysomes sur la localisation de DDX6 dans les polysomes. Par exemple,

en analysant des lysats de cellules dans lesquelles l'expression de LSM14A est déplétée, nous pourrions savoir si DDX6 reste localisée dans les polysomes, ou se relocalise dans des fractions plus légères. La question réciproque pourrait être également intéressante : l'expression de DDX6 a-t-elle une influence sur la localisation de ses partenaires dans les polysomes ?

De façon intéressante, une fraction des protéines ATXN2 et PABP est associée au polysomes chez la drosophile (Satterfield and Pallanck, 2006), suggérant que ATXN2 pourrait avoir un rôle dans la régulation de la traduction au niveau des polysomes. Des expériences préliminaires suggèrent la présence de ATXN2 et confirment la présence de PABPC1 dans les polysomes, dans les cellules humaines. Nous avons vu en introduction que la PABP favorise la traduction des ARNm en interagissant avec eIF4G *via* son motif PAM2. Or, ATXN2 porte également un motif PAM2. Satterfield et Pallanck proposent donc que ATXN2 pourrait entrer en compétition avec la PABP, et interagir avec eIF4G pour inhiber la traduction (**Figure D4**).

Elle pourrait alors recruter DDX6, qui à son tour recruterait le complexe de dégradation 5'-3' des ARNm. Elle pourrait également réprimer la traduction des ARNm *via* la voie des miARNs, étant observée comme nécessaire dans cette voie chez la drosophile (McCann et al., 2011).

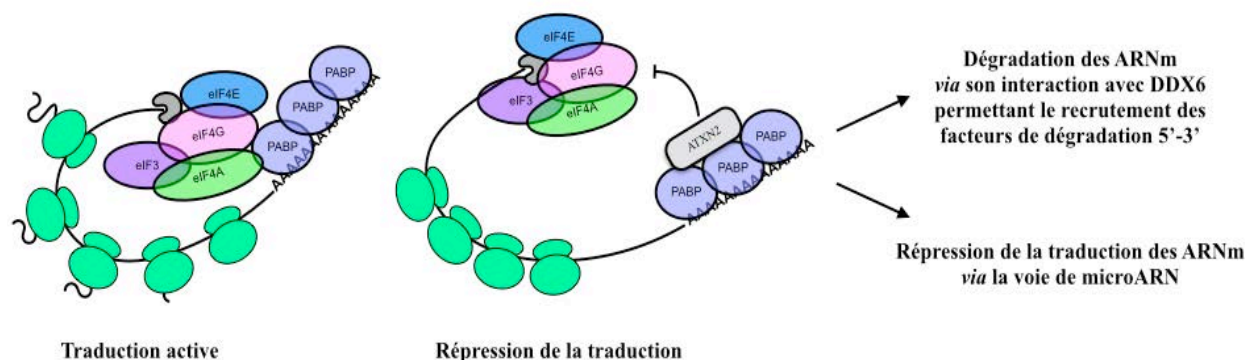


Figure D 4 : Répression de la traduction des ARNm par ATXN2, dans les polysomes

Néanmoins, les protéines du complexe RISC ne sont quasiment pas identifiées dans l'analyse de spectrométrie de masse à partir de cellules humaines, à l'exception d'AGO2 (104, 0) qui est identifiée dans les lysats traités à l'inhibiteur de RNases avec de faibles scores. Une étude récente montre la purification des complexes protéiques contenant DDX6 à partir de cellules HEK293, par une approche similaire à celle que nous avons utilisée. Elle montre également l'absence de peptides AGO (Bish et al., 2015). Or, des expériences de FRET montrent que DDX6 interagit avec AGO1 et AGO2 dans les cellules humaines (Chu and Rana, 2006; Rouya et al., 2014). De plus, un régulateur de la voie des miRNAs, MOV10 (1658 ; 168), interagissant avec AGO2 pour assurer le bon assemblage du complexe miRISC (Liu et al., 2012), est identifié avec un haut score dans l'échantillon traité à l'inhibiteur de RNases. Une hypothèse serait que DDX6 est en effet impliquée dans le complexe RISC, mais que ce complexe soit minoritaire dans les cellules HEK293, par rapport aux autres partenaires, comme les complexes de répression de la traduction, de dégradation 5'-3' des ARNm, ou le complexe composé des ataxines. Les protéines du complexe RISC passeraient donc en dessous du seuil de détection dans notre expérience. L'interaction entre DDX6 et les protéines AGO pourrait également être transitoire, ou bien perdue dans nos conditions expérimentales.

Caractérisation des complexes de petite taille impliquant DDX6

Une grande fraction de DDX6 est localisée dans des complexes plus légers (<80S), comme le montrent les analyses par western blot des gradients de sucrose à partir de cellules non traitées. Nos résultats montrent que toutes les protéines analysées pourraient partager avec DDX6 des complexes de petite taille. La résolution à laquelle sont réalisés nos gradients de sucrose ne permet pas de séparer ces complexes de petites tailles. Il serait donc intéressant de séparer les protéines sur des gradients centrifugés plus longtemps pour pouvoir caractériser différents complexes de petite taille. Des expériences préliminaires ont permis de mettre au point cette stratégie.

Alors que les régulations transcriptionnelles de l'expression des gènes ont été largement mises en avant comme processus biologiques essentiels depuis 1960, l'irruption des analyses à haut débit à partir des années 1990 a permis de mettre en lumière l'importance des régulations post-transcriptionnelles de l'expression des gènes. Plus d'un millier de protéines pouvant se lier à l'ARNm ont été identifiées chez l'homme, plus d'un millier de protéines qui pourraient donc avoir un rôle important des les régulations post-transcriptionnelles (Baltz et al., 2012).

Parmi celles-ci, l'hélicase à motif DEAD DDX6 a fait le centre de mon projet d'étude. Dans les cellules humaines, elle a effectivement un rôle important puisque nous avons montré qu'elle était principalement impliquée dans la dégradation et la répression dans ARNm. Notre analyse a aussi permis de mettre en évidence un complexe majeur impliquant DDX6, composé des ataxines 2 et 2-like, dont le rôle reste à élucider. Nos expériences ont également permis de montrer que DDX6 pouvait interagir avec des ARNm en cours de traduction (polysomes). DDX6 est donc impliquée dans un large spectre de régulations générales. Réprime-t-elle la traduction des ARNm de façon globale ? Cible-t-elle une certaine classe d'ARNm ? Des analyses de RNAseq sont menées en parallèle au laboratoire pour tenter de répondre à ces questions.

Matériel et Méthodes

1. Culture Bactérienne

200 µl de bactéries compétentes *E.coli* TG1, sont incubées 30 minutes dans la glace en présence du plasmide Flag-DDX6-HA. Les bactéries sont soumises à un choc thermique pendant 1 minute à 42°C. Après addition de 800 µl de milieu Luria Broth (milieu LB : Bactotryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g pour 1 litre pH 7,5), les bactéries transformées sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Une centrifugation de 5 minutes à 3500 r.p.m permet de récupérer un culot bactérien repris ensuite dans 80 µL de milieu LB puis étalé sur une boîte de pétri contenant l'antibiotique de sélection. La boîte est laissée à incuber une nuit à 37°C. Les clones recombinants seront ensuite analysés par digestion enzymatique par les enzymes de restriction souhaitées. L'ADN plasmidique est purifié avec le kit « GenElute Endotoxine free Plasmid Maxiprep » de chez Sigma™.

2. Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires ont été utilisées :

- les cellules HeLa (**H**enrietta **L**acks) qui proviennent de cellules tumorales d'épithélium utérin.
- les cellules HEK293 (**H**uman **E**mbryonic **K**idney) provenant de cellules embryonnaires de reins, transformées avec l'adénovirus 5.

2.1. Conditions de culture

Ces lignées cellulaires sont maintenues en culture dans une étuve humidifiée à 37°C et à 5% CO₂. Les cellules sont dissociées deux fois par semaine, avec une solution de 0.05% trypsine EDTA (Invitrogen™). Les cellules dissociées sont diluées et réensemencées dans un milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)-glutamax (Invitrogen™), supplémenté en SVF (Sérum de Veau Fœtal) (10%), pénicilline (1%), streptomycine (1%).

2.2. Transfections par le chlorure de calcium

24 heures avant la transfection, les cellules HEK 293 sont étalées à $2,7 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 15 cm de diamètre, dans du DMEM + 10% SVF, avec antibiotiques. Une lamelle traitée à la poly-lysine est déposée au fond d'une boîte de culture pour déterminer l'efficacité

de transfection. 4 heures avant la transfection, le milieu de culture est remplacé par du DMEM + 5% de SVF avec antibiotiques. 30 minutes avant la transfection, 45 µg d'ADN plasmidique et 125 mM de CaCl₂ sont mélangés dans un volume final de 2,5 mL pour une boîte de culture de 15cm de diamètre.

La préparation d'ADN est ajoutée au goutte à goutte dans 2,5 ml de tampon HEPES 2X (HEPES 42 mM, NaCl 274 mM, KCl 1mM, Na₂HPO₄·2H₂O 1,5 mM, D-Glucose 10mM), pH 7,5, en vortexant pour obtenir un précipité homogène. Le précipité se forme pendant 30 minutes à température ambiante. Le précipité est ajouté aux cellules. Après une nuit à l'étuve (37°C), les cellules HEK293 transfectées sont lavées dans du tampon TBS-CM (NaCl 150 mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 0,75 mM, Tris pH 7,4 25 mM, CaCl₂ 1mM et MgCl₂ 0,5 mM) et le milieu de culture est remplacé par du DMEM + 10% SVF avec antibiotiques. Les cellules sont récupérées 48h après.

Plasmide Flag-DDX6-HA

La protéine humaine DDX6 (ORF) a été sous-clonée dans un vecteur plasmidique pcDNA3-FLAG (BamH1/Not1) de telle sorte que l'étiquette FLAG soit en amont de DDX6 et en phase avec cette protéine. L'étiquette HA a été introduite par la suite, en aval de DDX6 et en phase avec cette dernière, en utilisant le kit « In-Fusion Advantage PCR cloning kit » (Clontech).

2.3. Réverse transfection de siARNs par la Lipofectamine™2000

La Lipofectamine™2000 (Life Technologies™) est utilisée pour améliorer l'efficacité de transfection des siARNs. La Lipofectamine™2000 est diluée dans un milieu Opti-MEM™ (Invitrogen™), moins riche que le DMEM, et sans sérum. Les siARNs sont préparés à raison de 600 pmol pour une boîte de 10 cm de diamètre, dans l'Opti-MEM™. Lipofectamine™2000 et siARNs sont mélangés et incubés à température ambiante pendant 20 minutes. Le mélange est ensuite directement déposé sur 4.10⁶ cellules préalablement étalées. Les cellules sont mises en culture sur la nuit, dans du DMEM + 10% SVF sans antibiotiques. Le lendemain matin, les cellules sont dédoublées dans du DMEM 10% SVF avec antibiotiques. Les cellules sont récupérées 48h plus tard.

2.4. Traitements des cellules

- La **cycloheximide** est un antibiotique qui inhibe l'activité de la sous unité 60S du ribosome, inhibant ainsi la synthèse protéique. Les ribosomes sont accumulés et figés sur les ARNm. Elle est utilisée à 10 µg/ml, 30 minutes à 37°C.
- La **puromycine** est un analogue structural du phénylalanyl-ARNt qui se lie au site A de la sous unité 60S du ribosome. Cette liaison met fin à la synthèse protéique, et les ribosomes se dissocient des ARNm en cours de traduction. Elle est utilisée à 100 µg/ml, 1 heure à 37°C.
- La **vinblastine** est une drogue qui inhibe la polymérisation de la tubuline en microtubules, inhibant ainsi la division cellulaire. Elle est utilisée à raison de 10 µM pendant 1 heure.
- **L'arsenite** induit un stress cellulaire et est utilisée à 0,5 mM pendant 30 minutes à 37°C.
- **L'EDTA**, chélateur des ions divalents, inhibe l'association des polysomes sur l'ARNm. Il est ajouté dans le tampon de lyse à 25 mM
- **Le choc thermique** est une autre forme de stress cellulaire que nous avons expérimenté en incubant les cellules pendant **2 heures à 30°C**.

3. Anticorps

DCP1A (lapin) donné par B. Seraphin (IGBMC, Strasbourg, France)
EDC3 (lapin) donné par J. Lykke-Andersen (Université de Californie, US)
PAT1B (lapin) donné par Nancy Standard (Université de Cambridge, UK)
eIF4A3 (lapin) et Y14 (lapin) donnés par Hervé le Hir (Ecole Normale Supérieure, Paris, France) (Saulière et al., 2012)
MLN51 (lapin) donné par Catherine Tomasetto (IGBMC, Strasbourg, France)
NCBP1 (lapin) donné par E. Izaurralde (MPI, Tuebingen)
ATXN2 (souris) et G3BP (souris) de chez BD Biosciences
Anti lapin ATXN2L (lapin) de chez Bethyl
TIA1 (chèvre), EDC4 (souris), eIF4E (souris), XRN1 (souris) de chez Santa Cruz Biotechnology (CA)

4E-T (chèvre) et LSM12 (lapin) de chez Abcam
LSM14B (lapin) et PABPC1 (souris) de chez Merk-Millipore
LSM14B (lapin) et α -tubuline (souris) de chez Sigma-Aldrich (France)
DDX6 (lapin) de chez Novus Biologicals
Protéine ribosomale S6 (lapin) de chez Cell Signaling Technology
PABPN1 (lapin) de chez Epitomics (Abcam)

Les anticorps secondaires proviennent de chez Jackson ImmunoResearch Laboratories.

4. TAP-tag (Tandem Affinity Purification –Tag)

Les lysats cytoplasmiques sont préparés dans du tampon NET (Tris 50mM, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% NP40) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics™) et de 1mM DTT, 30 minutes dans la glace en présence de 65 unités/ml d'inhibiteur de RNases (RNaseOut recombinant ribonuclease inhibitor, Promega™), ou de 20 μ g/ml de RNase A (Euromedex™). Noyaux et cytoplasmes sont séparés par centrifugation à 500 g pendant 10 minutes, à 4°C. Les protéines sont dosées à l'aide du kit « dosage Bradford ».

10 μ l 50% slurry de chaque résine sont utilisés par boîte de culture de 15 cm de diamètre. Les résines sont lavées 2 fois dans du PBS. Un dernier lavage est réalisé dans le tampon NET. Dans un premier temps, la résine contrôle glutathionne agarose (Thermo Scientific™) est ajoutée aux extraits protéiques pour éliminer les protéines qui se lient aux résines de façon non spécifique. Le mélange est incubé pendant 1 heure à 4°C sur roue. Les surnageants sont récupérés dans de nouveaux tubes et incubés avec la résine anti-FLAG (anti-Flag affinity gel, Sigma Aldrich™) pendant 2 heures à 4°C, sur roue. La résine est lavée 3 fois dans du tampon NET sans NP40, et les complexes sont élués avec 250 μ g/ml de peptide FLAG (Sigma- Aldrich™) pendant 1 heure à 4°C, sur roue. Les surnageants sont récupérés et incubés avec la résine anti-HA (monoclonal anti-HA agarose, Sigma-Aldrich™) la nuit à 4°C, sur roue.

Après lavages de la résine HA au tampon NET sans NP40, les protéines retenues sur la résine sont éluées avec du tampon Laemmli (Tris pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 5%, Bleu de bromophénol 0,01%). Les protéines sont dénaturées 5 minutes à 100°C, et séparées

sur gel SDS-PAGE.

5. Immunoprécipitations

Les lysats cytoplasmiques sont préparés dans du tampon NET supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Roche Diagnostics™) et de 1 mM DTT, 15 minutes dans la glace. Les débris membranaires sont culotés par centrifugation à 1600 g pendant 10 minutes à 4°C. Un dosage protéique est réalisé avec le Kit « dosage Bardord », et l'anticorps anti DDX6 est ajouté aux extraits à 0,5 µg pour 2 mg d'extrait, et 1,5 µg d'anticorps pour 5 mg d'extrait. Le mélange est incubé 1 heure à 4°C sur roue avant d'ajouter X µl de résine magnétique Dynabeads® Protéine A (Life technologies™) qui a été préparée suivant le protocole fourni. Le mélange est à nouveau incubé 1 heure à 4°C sur roue. Après X lavages, les complexes fixés sont élués avec du tampon Laemmli. Les protéines sont dénaturées 5 minutes à 100°C, et séparées sur gel SDS-PAGE.

6. Western Blot

Les échantillons sont séparés sur un gel d'acrylamide en gradient dénaturant 4-12% ("NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel" Invitrogen™). Les protéines présentes sur le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (PerkinElmer™). Le transfert s'effectue pendant 1h à 4°C à 100V, dans un tampon de transfert (Tris pH 6,8 1,5 M, glycine 7,2 M, Ethanol 10%).

Les membranes sont bloquées 1 heure à température ambiante, avec du PBS 5% lait pour les membranes de nitrocellulose, ou avec du PBS-T (PBS, 0,1% Tween-20) 5% lait pour les membranes de PVDF. Les membranes sont alors incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué dans du PBS/PBS-T 5% lait selon la membrane. Après 3 rinçages de 5 minutes avec du PBS/PBS-T, les membranes sont à nouveau bloquées pendant 1 heure avec du PBS/PBS-T 5% lait, à température ambiante. L'anticorps secondaire dilué dans du PBS/PBS-T 5% lait est mis en contact avec les membranes pendant 1h à température ambiante. Après 5 rinçages de 5 minutes avec du PBS/PBS-T Les membranes sont révélées avec le kit Western lightning plus (Perkin Elmer). La chimioluminescence est détectée en chambre noire, un film autoradiographique (CL-XPosure film, Pierce™) est mis en contact avec la membrane et révélé.

7. Immunofluorescence

Les lamelles sont fixées avec du méthanol à -20°C pendant 3 minutes. L'anticorps primaire est dilué dans du PBS+BSA 0.1% et incubé 1 heure à température ambiante. 3 lavages sont ensuite effectués avec 2mL de PBS afin d'éliminer l'excès d'anticorps. On procède identiquement pour l'anticorps secondaire qui est couplé à un marqueur fluorescent. Les lamelles sont plongées 10 secondes dans une solution de DAPI (à 250ng/ml) puis séchées à l'éthanol. Sur une lame, une goutte de est déposée, la lamelle est déposée coté cellules sur une goutte de Citifluor (Connaught, building, City University, Northampton Square, London EC1-HB) La lamelle est ensuite scellée avec du vernis à ongle sur la lame. L'observation se fait avec un microscope à fluorescence (Leica DMR, objectif à immersion 63X1.32, Camera Micromax CCD avec le logiciel Métamorphe).

8. Gradients de sucrose

Les solutions de sucrose 10% et 50% ont été préparées dans du tampon de gradient (HEPES pH 7,5 20 mM, KCl 250 mM, MgCl_2 20 mM, DTT 2 mM).

Les cellules sont rincées au PBS glacé, et les récolter dans 2 fois 2,5 ml de PBS glacé, dans des tubes de 15 ml, dans la glace. Elles sont récupérées en centrifugeant 5 minutes à 1000 t.p.m, à 4°C . Les culots sont repris dans du tampon de lyse (HEPES pH 7,5 20 mM, KCl 250 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, NP40 0,5%) (300 uL de tampon de lyse pour un culot équivalent à 1 boîte de culture cellulaire de 10 cm de diamètre).

Les lysats sont transférés dans des tubes eppendorf de 2 mL, et laisser la lyse se faire pendant 5 minutes dans la glace. Pipeter en aller-retour pour lyser les cellules. Centrifuger 5 minutes à 500 g pour éliminer les débris cellulaires tout en conservant les polysomes associés. Récupérer les surnageants dans des nouveaux tubes de 2 mL et faire la mesure d'absorbance à 260nm (ARN). Déposer un volume de lysat cellulaire équivalent à 50 en densité optique sur les gradients de sucrose 10%-50%. Centrifuger à 39000 r.p.m pendant 2h45 à 4°C (rotor Beckman SW41-Ti). Les gradients ont été récoltés à l'aide du collecteur de gradients Teledyne Isco, collecteur sur lequel est branché un spectrophotomètre qui lie la densité optique à 254 nm, en temps réel. Le spectrophotomètre est branché à un moniteur qui trace le profile en direct également.

Les protéines sont précipitées dans 2 volumes d'éthanol absolu. Le mélange est placé sur la nuit à -80°C après avoir été vortexé. Les fractions sont centrifugées à 15000 rpm pendant 30 min. à 4°C. Les surnageants sont décantés et les culots sont rincés à l'éthanol 70%. Les fractions sont à nouveau centrifugées à la même vitesse pendant 15 minutes et le surnageant décanté. Les fractions sont mises à sécher à 37°C pendant 4 heures. Les protéines sont resuspendues dans 30 µl de tampon Laemmli et dénaturées à 100°C avant d'être déposées sur gel dénaturants

9. Spectrométrie de masse

Les échantillons ont été séparés sur un gel de polyacrylamide Nu-PAGE 4%–12%. Le gel a été marqué par incubation dans du SimplyBlue SafeStain de chez Life Technologies (France), compatible avec la spectrométrie de masse. Chacune des pistes envoyées au centre de protéomique de l'université de Cambridge a été coupée en 6 bandes.

Après digestion à la trypsine, les peptides extraits des bandes de gel ont été séparés sur une colonne de chromatographie en phase liquide (LC). Ils ont ensuite été ionisés dans un easy-spray avant d'être analysés en tandem (MS/MS) : les ions générés ont été analysés une première fois, puis les ions stables issus de cette première analyse ont été cassés dans une cellule de collision et analysés une seconde fois.

Les spectres des peptides obtenus ont été analysés avec le logiciel Mascot (Matrix Science, Londres, UK), un algorithme d'identification de protéines qui compare les masses peptidiques obtenues expérimentalement avec celles calculées théoriquement à partir des séquences protéiques correspondantes, regroupées dans une banque de données (Uniprot humaine dans notre cas).

Références

- Aitken, C.E., Lorsch, J.R., 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 568–576. doi:10.1038/nsmb.2303
- Aizer, A., Brody, Y., Ler, L.W., Sonenberg, N., Singer, R.H., Shav-Tal, Y., 2008. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Molecular biology of the cell* 19, 4154–4166.
- Akashi, M., Shaw, G., Gross, M., Saito, M., Koeffler, H.P., 1991. Role of AUUU sequences in stabilization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor RNA in stimulated cells. *Blood* 78, 2005–2012.
- Albrecht, M., Lengauer, T., 2004. Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Letters* 569, 18–26. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.126
- Anderson, J.S.J., Parker, R., 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex.
- Anderson, P., Kedersha, N., 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 141–150. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.003
- Anderson, P., Kedersha, N., 2006. RNA granules. *The Journal of Cell Biology* 172, 803–808. doi:10.1083/jcb.200512082
- Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Rainer Heintzmann, Achsel Tilmann, Rivera-Pomar, R., Luhrmann, R., 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11, 717–727. doi:10.1261/rna.2340405
- Andrey V. Pisarev, Victoria G. Kolupaeva, Vera P. Pisareva, William C. Merrick, Christopher U.T. Hellen, Tatyana V. Pestova, 2006. Specific functional interactions of nucleotides at key-3 and+ 4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D.J., Koonin, E.V., 2000. Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 11319–11324.
- Aslam, A., Mittal, S., Koch, F., Andrau, J.-C., Winkler, G.S., 2009. The Ccr4–NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Molecular biology of the cell* 20, 3840–3850.

- Bakheet, T., 2006. ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Research* 34, D111–D114. doi:10.1093/nar/gkj052
- Balagopal, V., Parker, R., 2009. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 403–408. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.005
- Barbee, S.A., Estes, P.S., Cziko, A.-M., Hillebrand, J., Luedeman, R.A., Collier, J.M., Johnson, N., Howlett, I.C., Geng, C., Ueda, R., others, 2006. Staufen-and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 52, 997–1009.
- Barbosa, C., Peixeiro, I., Romão, L., 2013. Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease. *PLoS Genetics* 9, e1003529. doi:10.1371/journal.pgen.1003529
- Bashkirov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.-M., Heyer, W.-D., 1997. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *The Journal of cell biology* 136, 761–773.
- Behm-Ansmant, I., 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development* 20, 1885–1898. doi:10.1101/gad.1424106
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell* 125, 1111–1124. doi:10.1016/j.cell.2006.04.031
- Bianchin, C., Mauxion F., Sentis S., Séraphin B, Corbo L., 2005. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* 11, 487–494. doi:10.1261/rna.7135305
- Boeck, R., Tarun, S., Rieger, M., Deardorff, J.A., Müller-Auer, S., Sachs, A.B., 1996. The Yeast Pan2 Protein Is Required for Poly(A)-binding Protein-stimulated Poly(A)-nuclease Activity.
- Bonnerot, C., Boeck, R., Lapeyre, B., 2000. The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Molecular and Cellular Biology* 20, 5939–5946.
- Braun, J.E., Triteschler, F., Haas, G., Igreja, C., Truffault, V., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., 2010. The C-terminal α - α superhelix of Pat is required for mRNA decapping in metazoa. *The EMBO journal* 29, 2368–2380.

- Bregues, M., Teixeira, D., Parker, R., 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486–489.
- Brown, C.E., Sachs, A.B., 1998. Poly (A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Molecular and Cellular Biology* 18, 6548–6559.
- Buchan, J.R., 2014. mRNP granules: Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biology* 11, 1019–1030. doi:10.4161/15476286.2014.972208
- Buchan, J.R., Muhlrad, D., Parker, R., 2008. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 183, 441–455. doi:10.1083/jcb.200807043
- Buu, L.-M., Jang, L.-T., Lee, F.-J.S., 2004. The Yeast RNA-binding Protein Rbp1p Modifies the Stability of Mitochondrial Porin mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 279, 453–462. doi:10.1074/jbc.M309278200
- Calvo, S.E., Pagliarini, D.J., Mootha, V.K., 2009. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 7507–7512.
- Cao, D., Parker, R., 2003. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113, 533–545.
- Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., Cerami, A., 1986. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, 1670–1674.
- Carbonaro, M., O'Brate, A., Giannakakou, P., 2011. Microtubule disruption targets HIF-1 mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *The Journal of Cell Biology* 192, 83–99. doi:10.1083/jcb.201004145
- Carmel, A.B., Matthews, B.W., 2004. Crystal structure of the BstDEAD N-terminal domain: A novel DEAD protein from *Bacillus stearothermophilus*. *RNA* 10, 66–74. doi:10.1261/rna.5134304
- Caruthers, J.M., Johnson, E.R., McKay, D.B., 2000. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 13080–13085.
- Caruthers, J.M., McKay, D.B., 2002. Helicase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology* 12, 123–133.

- Chan, E.K., Fritzler, M.J., 2013. Ten years of progress in gw/p body research. Springer.
- Chang, J.S., Tan, L., Schedl, P., 1999. The Drosophila CPEB Homolog, Orb, Is Required for Oskar Protein Expression in Oocytes 91–106.
- Chang, L.-C., Lee, F.-J.S., 2012a. The RNA helicase Dhh1p cooperates with Rbp1p to promote porin mRNA decay via its non-conserved C-terminal domain. *Nucleic Acids Research* 40, 1331–1344. doi:10.1093/nar/gkr803
- Chang, L.-C., Lee, F.-J.S., 2012b. The RNA helicase Dhh1p cooperates with Rbp1p to promote porin mRNA decay via its non-conserved C-terminal domain. *Nucleic Acids Research* 40, 1331–1344. doi:10.1093/nar/gkr803
- Chazal, P.-E., Daguene, E., Wendling, C., Ulryck, N., Tomasetto, C., Sargueil, B., Le Hir, H., 2013. EJC core component MLN51 interacts with eIF3 and activates translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 5903–5908. doi:10.1073/pnas.1218732110
- Chen, C.-Y., Gherzi, R., Ong, S.-E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., Karin, M., 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451–464.
- Cheng, Z., Collier, J., Parker, R., Song, H., 2005. Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p. *RNA* 11, 1258–1270. doi:10.1261/rna.2920905
- Chen, J., Chiang, Y.-C., Denis, C.L., 2002. CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase.
- Chen, Y., Boland, A., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C.-T., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., 2014. A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing. *Molecular Cell* 54, 737–750. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.034
- Cho, P.F., Gamberi, C., Cho-Park, Y.A., Cho-Park, I.B., Lasko, P., Sonenberg, N., 2006. Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in Drosophila Embryos 2035–2041.
- Chritton, J.J., Wickens, M., 2011. A Role for the Poly(A)-binding Protein Pab1p in PUF Protein-mediated Repression. *Journal of Biological Chemistry* 286, 33268–33278. doi:10.1074/jbc.M111.264572
- Chu, C., Rana, T.M., 2006. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS biology* 4, e210.

- Clark, L.B., Palaniswamy Viswanathan (Nom), Quigley, G., Chiang, Y.-C., McMahon, J.S., Yao, G., Chen, J., Nelsbach, A., Denis, C.L., 2004. Systematic Mutagenesis of the Leucine-rich Repeat (LRR) Domain of CCR4 Reveals Specific Sites for Binding to CAF1 and a Separate Critical Role for the LRR in CCR4 Deadenylation Activity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13616–13623. doi:10.1074/jbc.M313202200
- Colgan, D.F., Manley, J.L., 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & development* 11, 2755–2766.
- Coller, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Parker, R., 2001. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylation complexes. doi:10.1017/S135583820101007X
- Coller, J., Parker, R., 2005a. General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping. *Cell* 122, 875–886. doi:10.1016/j.cell.2005.07.012
- Coller, J., Parker, R., 2005b. General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping. *Cell* 122, 875–886. doi:10.1016/j.cell.2005.07.012
- Coller, J., Parker, R., 2004. Eucaryotic mRNA decapping. *Annual Review of Biochemistry* 861–890.
- Cooke, A., Prigge, A., Wickens, M., 2010. Translational Repression by Deadenylation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 28506–28513. doi:10.1074/jbc.M110.150763
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., Linder, P., 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37. doi:10.1016/j.gene.2005.10.019
- Cougot, N., Babajko, S., Séraphin, B., 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *The Journal of Cell Biology* 165, 31–40. doi:10.1083/jcb.200309008
- Cougot, N., Daguenet, E., Baguet, A., Cavalier, A., Thomas, D., Bellaud, P., Fautrel, A., Godey, F., Bertrand, E., Tomasetto, C., Gillet, R., 2014. Overexpression of MLN51 triggers P-body disassembly and formation of a new type of RNA granules. *Journal of Cell Science* 127, 4692–4701. doi:10.1242/jcs.154500
- Decker, C.J., Teixeira, D., Parker, R., 2007. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* 179, 437–449. doi:10.1083/jcb.200704147

- Denis, C.L., Chen, J., 2003. The CCR4–NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 73, 221–250.
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., Han, M., 2005. The Developmental Timing Regulator AIN-1 Interacts with miRISCs and May Target the Argonaute Protein ALG-1 to Cytoplasmic P Bodies in *C. elegans*. *Molecular Cell* 19, 437–447. doi:10.1016/j.molcel.2005.07.013
- Dresios, J., Aschrafi, A., Owens, G.C., Vanderklish, P.W., Edelman, G.M., Mauro, V.P., 2005. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1865–1870.
- Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.-H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., Lejeune, F., 2007. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *The Journal of Cell Biology* 178, 1145–1160. doi:10.1083/jcb.200611086
- Dutta, A., Zheng, S., Jain, D., Cameron, C.E., Reese, J.C., 2011. Intermolecular Interactions within the Abundant DEAD-box Protein Dhh1 Regulate Its Activity in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 286, 27454–27470. doi:10.1074/jbc.M111.220251
- Eliseeva, I.A., Lyabin, D.N., Ovchinnikov, L.P., 2013. Poly(A)-binding proteins: Structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)* 78, 1377–1391. doi:10.1134/S0006297913130014
- Ernault-Lange, M., Bacconnais, S., Harper, M., Minshall, N., Souquere, S., Boudier, T., Benard, M., Andrey, P., Pierron, G., Kress, M., Standart, N., le Cam, E., Weil, D., 2012. Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein Rck/p54. *RNA* 18, 1702–1715. doi:10.1261/rna.034314.112
- Ernault-Lange, M., Wilczynska, A., Harper, M., Aigueperse, C., Dautry, F., Kress, M., Weil, D., 2009. Nucleocytoplasmic traffic of CPEB1 and accumulation in Crm1 nucleolar bodies. *Molecular biology of the cell* 20, 176–187.
- Esteller, M., 2011. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 12, 861–874. doi:10.1038/nrg3074

- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., Izaurralde, E., 2007. P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Molecular and Cellular Biology* 27, 3970–3981. doi:10.1128/MCB.00128-07
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., Izaurralde, E., 2008. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15, 21–32. doi:10.1261/rna.1399509
- Evans, D.R., Rasmussen, C., Hanic-Joyce, P.J., Johnston, G.C., Singer, R.A., Barnes, C.A., 1995. Mutational analysis of the Prt1 protein subunit of yeast translation initiation factor 3. *Molecular and cellular biology* 15, 4525–4535.
- Eystathiou, T., 2003. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9, 1171–1173. doi:10.1261/rna.5810203
- Eystathiou, T., Chan, E.K., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., Fritzler, M.J., 2002. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular biology of the cell* 13, 1338–1351.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., 2012. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 586–593. doi:10.1038/nsmb.2296
- Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., Lykke-Andersen, J., 2005. Multiple Processing Body Factors and the ARE Binding Protein TTP Activate mRNA Decapping. *Molecular Cell* 20, 905–915. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.031
- Fernández-Miranda, G., Méndez, R., 2012. The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Research Reviews* 11, 460–472. doi:10.1016/j.arr.2012.03.004
- Ferraiuolo, M.A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E.L., Schoenberg, D.R., Sonenberg, N., 2005. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *The Journal of Cell Biology* 170, 913–924. doi:10.1083/jcb.200504039
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* 2008, 102–114. doi:10.1038/nrg2290

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Koskas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Franks, T.M., Lykke-Andersen, J., 2007. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes & Development* 21, 719–735. doi:10.1101/gad.1494707
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B.W., Kato, S., 2007. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature Cell Biology* 9, 604–611. doi:10.1038/ncb1577
- Gallo, C.M., Munro, E., Rasoloson, D., Merritt, C., Seydoux, G., 2008. Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. *Developmental Biology* 323, 76–87. doi:10.1016/j.ydbio.2008.07.008
- Gareau, C., Martel, D., Coudert, L., Mellaoui, S., Mazroui, R., 2013. Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein granules formation and dynamics in *Drosophila*. *Biology Open* 2, 68–81. doi:10.1242/bio.20123012
- Gebauer, F., Richter, J.D., 1996. Mouse cytoplasmic polyadenylation element binding protein: an evolutionarily conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of c-mos mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14602–14607.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., Anderson, P., 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular biology of the cell* 15, 5383–5398.
- Giorgi, C., Moore, M.J., 2007. The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18, 186–193. doi:10.1016/j.semcdb.2007.01.002
- Glasmacher, E., Hoefig, K.P., Vogel, K.U., Rath, N., Du, L., Wolf, C., Kremmer, E., Wang, X., Heissmeyer, V., 2010. Roquin binds inducible costimulator mRNA and effectors of mRNA decay to induce microRNA-independent post-transcriptional repression. *Nature Immunology* 11, 725–733. doi:10.1038/ni.1902

- Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Hook, B.A., Wickens, M., 2007. PUF Protein-mediated Deadenylation Is Catalyzed by Ccr4p. *Journal of Biological Chemistry* 282, 109–114. doi:10.1074/jbc.M609413200
- Gowrishankar, G., Winzen, R., Dittrich-Breiholz, O., Redich, N., Kracht, M., Holtmann, H., 2006. Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biological Chemistry* 387. doi:10.1515/BC.2006.043
- Grüllich, C., Duvoisin, R.M., Wiedmann, M., van Leyen, K., 2001. Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS letters* 489, 51–54.
- Guil, S., Cáceres, J.F., 2007. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 591–596. doi:10.1038/nsmb1250
- Gu, M., Lima, C.D., 2005. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 99–106. doi:10.1016/j.sbi.2005.01.009
- Guzeloglu-Kayisli, O., Pauli, S., Demir, H., Lalioti, M.D., Sakkas, D., Seli, E., 2008. Identification and characterization of human embryonic poly(A) binding protein (EPAB). *Molecular Human Reproduction* 14, 581–588. doi:10.1093/molehr/gan047
- Haas, G., Braun, J.E., Igreja, C., Triteschler, F., Nishihara, T., Izaurralde, E., 2010. HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. *The Journal of Cell Biology* 189, 289–302. doi:10.1083/jcb.200910141
- Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K., Ambros, V., 2009. nhl-2 Modulates MicroRNA Activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 136, 926–938. doi:10.1016/j.cell.2009.01.053
- Hanazawa, M., Yonetani, M., Sugimoto, A., 2011. PGL proteins self associate and bind RNPs to mediate germ granule assembly in *C. elegans*. *The Journal of Cell Biology* 192, 929–937. doi:10.1083/jcb.201010106
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., Kim, V.N., 2006. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* 125, 887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043

- Harigaya, Y., Jones, B.N., Muhlrads, D., Gross, J.D., Parker, R., 2010. Identification and Analysis of the Interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 30, 1446–1456. doi:10.1128/MCB.01305-09
- Hata, H., Mitsui, H., Liu, H., Bai, Y., Denis, C.L., Shimizu, Y., Sakai, A., 1998. Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 571–579.
- Hatfield, L., Beelman, C.A., Stevens, A., Parker, R., 1996. Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16, 5830–5838.
- Helfer, S., Schott, J., Stoecklin, G., Förstemann, K., 2012. AU-Rich Element-Mediated mRNA Decay Can Occur Independently of the miRNA Machinery in Mouse Embryonic Fibroblasts and *Drosophila* S2-Cells. *PLoS ONE* 7, e28907. doi:10.1371/journal.pone.0028907
- Hentze, M.W., Caughman, S.W., Rouault, T.A., Barriocanal, J.G., Dancis, A., Harford, J.B., Klausner, R.D., 1987. Identification of the Iron Responsive Element for the Translational Regulation of Human Ferritin mRNA. *Science* 238, 1568–1570.
- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., Mathews, M.B., 2012. Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a011528–a011528. doi:10.1101/cshperspect.a011528
- Hilgers, V., Teixeira D., Parker, R., 2006. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 12, 1835–1845. doi:10.1261/rna.241006
- Holcik, M., Sonenberg, N., 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 318–327. doi:10.1038/nrm1618
- Hoyle, N.P., Castelli, L.M., Campbell, S.G., Holmes, L.E.A., Ashe, M.P., 2007. Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *The Journal of Cell Biology* 179, 65–74. doi:10.1083/jcb.200707010
- Huang, Y.-S., Kan, M.-C., Lin, C.-L., Richter, J.D., 2006. CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *The EMBO journal* 25, 4865–4876.

- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 12, 99–110. doi:10.1038/nrg2936
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lührmann, R., Achsel, T., 2002. The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *Rna* 8, 1489–1501.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2010a. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 113–127. doi:10.1038/nrm2838
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2010b. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 113–127. doi:10.1038/nrm2838
- Jackson, R.J., Standart, N., 2007. How do microRNAs regulate gene expression. *Sci Stke* 367.
- Jacob, F., Monod, J., 1960. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins 318–35G.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature Cell Biology* 7, 1267–1274. doi:10.1038/ncb1334
- Jangra, R.K., Yi, M., Lemon, S.M., 2010. DDX6 (Rck/p54) Is Required for Efficient Hepatitis C Virus Replication but Not for Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation. *Journal of Virology* 84, 6810–6824. doi:10.1128/JVI.00397-10
- Jinek, M., Coyle, S.M., Doudna, J.A., 2011. Coupled 5' Nucleotide Recognition and Processivity in Xrn1-Mediated mRNA Decay. *Molecular Cell* 41, 600–608. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.004
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.-C., Gram, H., Han, J., 2005. Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability. *Cell* 120, 623–634. doi:10.1016/j.cell.2004.12.038
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J., 2005. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* 120, 635–647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014
- Jurica, M.S., Moore, M.J., 2003. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell* 12, 5–14.

- Kaehler, C., Isensee, J., Nonhoff, U., Terrey, M., Hucho, T., Lehrach, H., Krobitsch, S., 2012. Ataxin-2-Like Is a Regulator of Stress Granules and Processing Bodies. *PLoS ONE* 7, e50134. doi:10.1371/journal.pone.0050134
- Kamenska, A., Lu, W.-T., Kubacka, D., Broomhead, H., Minshall, N., Bushell, M., Standart, N., 2014. Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Research* 42, 3298–3313. doi:10.1093/nar/gkt1265
- Kapp, L.D., Lorsch, J.R., 2004. GTP-dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator tRNA by Translation Factor eIF2. *Journal of Molecular Biology* 335, 923–936. doi:10.1016/j.jmb.2003.11.025
- Kawasaki, I., Amiri A., Fan Y., Meyer N., Dunkelbarger S., Motohashi T., Karachima T., Bossinger O., Strome S., 2004. The PGL Family Proteins Associate With Germ Granules and Function Redundantly in *Caenorhabditis elegans* Germline Development. *Genetics* 167, 645–661. doi:10.1534/genetics.103.023093
- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I.J., Stakl, J., Anderson, P., 2002. Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNA^{iMet})– Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules 195–210.
- Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., Anderson, P., 2000. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* 151, 1257–1268.
- Kedersha, N., Gupta, M., Li Wei, Miller, I.J., Anderson, P., 1999. RNA-binding Proteins TIA-1 and TIAR Link the Phosphorylation of eIF-2 alpha to the Assembly of Mammalian Stress Granules 1431–1441.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., Anderson, P., 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of Cell Biology* 871–884. doi:10.1083/jcb.200502088
- Kervestin, S., Jacobson, A., 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 700–712. doi:10.1038/nrm3454
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., Sonenberg, N., 2001. Dual Interactions of the

- Translational Repressor Paip2 with Poly(A) Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology* 21, 5200–5213. doi:10.1128/MCB.21.15.5200-5213.2001
- Kim, J.H., Richter, J.D., 2007. RINGO/cdk1 and CPEB mediate poly(A) tail stabilization and translational regulation by ePAB. *Genes & Development* 21, 2571–2579. doi:10.1101/gad.1593007
- Kim, J.H., Richter, J.D., 2006. Opposing Polymerase-Deadenylase Activities Regulate Cytoplasmic Polyadenylation. *Molecular Cell* 24, 173–183. doi:10.1016/j.molcel.2006.08.016
- Kong, J., Lasko, P., 2012. Translational control in cellular and developmental processes. *Nature Reviews Genetics* 13, 383–394. doi:10.1038/nrg3184
- Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Hoheisel, J.D., Clayton, C., Carrington, M., 2010. The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *Journal of Cell Science* 123, 699–711. doi:10.1242/jcs.058511
- Kshirsagar, M., Parker, R., 2003. Identification of Edc3p as an Enhancer of mRNA Decapping in *Saccharomyces cerevisiae* 729–739.
- Kühn, U., Wahle, E., 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1678, 67–84. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.03.008
- Kwon, S., Zhang, Y., Matthias, P., 2007. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes & Development* 21, 3381–3394. doi:10.1101/gad.461107
- Lackner, D.H., Bähler, J., 2008. Chapter 5 Translational Control of Gene Expression, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 199–251.
- Lau, N.-C., Kolkman, A., Van Schaik, F.M.A., Mulder, K.W., Pijnappel, W.W.M.P., Heck, A.J.R., Timmers, H.T.M., 2009. Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits 443–453.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., E.Marquat, L., J.Moore, M., 2000. The spliceosome deposits multiple protein 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions.
- Leung, A.K., Calabrese, J.M., Sharp, P.A., 2006. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 18125–18130.

- Li, J.J., Bickel, P.J., Biggin, M.D., 2014. System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals. *PeerJ* 2, e270. doi:10.7717/peerj.270
- Linder, P., Lasko, P., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P., Nishi, K., Schnier, J., Piotr, S., 1989. Birth of the D-E-A-D box 121–122.
- Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W., 2011. Myosin Va Is Required for P Body but Not Stress Granule Formation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 11519–11528. doi:10.1074/jbc.M110.182808
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., Kiledjian, M., 2002. The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *The EMBO Journal* 4699–4708.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology* 7, 719–723. doi:10.1038/ncb1274
- Liu, X., Fortin, K., Mourelatos, Z., 2008. MicroRNAs: Biogenesis and Molecular Functions. *Brain Pathology* 18, 113–121. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x
- Loschi, M., Leishman, C.C., Berardone, N., Boccaccio, G.L., 2009. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. *Journal of Cell Science* 122, 3973–3982. doi:10.1242/jcs.051383
- Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J., Wickens, M., 2000. CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes & development* 14, 2596–2609.
- Lykke-Andersen, J., Wagner, E., 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development* 19, 351–361.
- Maag, D., Fekete, C.A., Gryczynski, Z., Lorsch, J.R., 2005. A Conformational Change in the Eukaryotic Translation Preinitiation Complex and Release of eIF1 Signal Recognition of the Start Codon. *Molecular Cell* 17, 265–275. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.051
- Mair, G.R., Braks, J.A., Garver, L.S., Wiegant, J.C., Hall, N., Dirks, R.W., Khan, S.M., Dimopoulos, G., Janse, C.J., Waters, A.P., 2006. Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* 313, 667–669.

- Majumdar, R., Bandyopadhyay, A., Maitra, U., 2003. Mammalian Translation Initiation Factor eIF1 Functions with eIF1A and eIF3 in the Formation of a Stable 40 S Preinitiation Complex. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6580–6587. doi:10.1074/jbc.M210357200
- Marilyn Kozak, 1991. Structural Features in Eukaryotic mRNAs That Modulate the Initiation of Translation. *The journal of biological chemistry*.
- Marnef, A., Maldonado, M., Bugaut, A., Balasubramanian, S., Kress, M., Weil, D., Standart, N., 2010. Distinct functions of maternal and somatic Pat1 protein paralogs. *RNA* 16, 2094–2107. doi:10.1261/rna.2295410
- Marnef, A., Sommerville, J., Lodomery, M.R., 2009. RAP55: Insights into an evolutionarily conserved protein family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 977–981. doi:10.1016/j.biocel.2008.06.015
- Marnef, A., Weil, D., Standart, N., 2012. RNA-related nuclear functions of human Pat1b, the P-body mRNA decay factor. *Molecular biology of the cell* 23, 213–224.
- Martin-Marcos, P., Cheung, Y.-N., Hinnebusch, A.G., 2011. Functional Elements in Initiation Factors 1, 1A, and 2 Discriminate against Poor AUG Context and Non-AUG Start Codons. *Molecular and Cellular Biology* 31, 4814–4831. doi:10.1128/MCB.05819-11
- Mata, J., Marguerat, S., Bähler, J., 2005. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 506–514. doi:10.1016/j.tibs.2005.07.005
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., Filipowicz, W., Duchaine, T.F., Sonenberg, N., 2007. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F. *Science* 317, 1764–1767. doi:10.1126/science.1147939
- Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., Filipowicz, W., 2014a. Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Molecular Cell* 54, 751–765. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.036
- Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., Filipowicz, W., 2014b. Structural and

- Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Molecular Cell* 54, 751–765. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.036
- Mazroui, R., Huot, M.-E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., Khandjian, E.W., 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Human molecular genetics* 11, 3007–3017.
- Meijer, H.A., Smith, E.M., Bushell, M., 2014. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochemical Society Transactions* 42, 1135–1140. doi:10.1042/BST20140142
- Mendez, R., Hake, L.E., Andresson, T., Littlepage, L.E., Ruderman, J.V., Richter, J.D., 2000. Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 404, 298–302.
- Mendez, R., Richter, J.D., 2001. Translational control by CPEB : a means to the end.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G., others, 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3, 1–10.
- Miller, J.N., Pearce, D.A., 2014. Nonsense-mediated decay in genetic disease: Friend or foe? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 762, 52–64. doi:10.1016/j.mrrev.2014.05.001
- Miller, W.A., Wang, Z., Treder, K., 2007. The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochemical Society Transactions* 35, 1629. doi:10.1042/BST0351629
- Miller, W.A., White, K.A., 2006. Long-distance RNA-RNA interactions in plant virus gene expression and replication. *Annual review of phytopathology* 44, 447.
- Minshall, N., Kress, M., Weil, D., Standart, N., 2009. Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. *Molecular biology of the cell* 20, 2464–2472.
- Minshall, N., Nancy Standart, 2004. The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. *Nucleic Acids Research* 32, 1325–1334. doi:10.1093/nar/gkh303
- Minshall, N., Reiter, M.H., Weil, D., Standart, N., 2007. CPEB Interacts with an Ovary-specific eIF4E and 4E-T in Early *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 282, 37389–37401. doi:10.1074/jbc.M704629200

- Mokrejs, M., Masek, T., Vopalensky, V., Hlubucek, P., Delbos, P., Pospisek, M., 2010. IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Research* 38, D131–D136. doi:10.1093/nar/gkp981
- Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., Weil, D., 2008. Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Molecular biology of the cell* 19, 4469–4479.
- Muhlrad, D., Decker, C.J., Parker, R., 1995. Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2145–2156.
- Muhlrad, D., Parker, R., 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping.
- Muhlrad, D., Parker, R., 1992. Mutations affecting stability and deadenylation of the yeast MFA2 transcript. *Genes & Development* 6, 2100–2111.
- Murray, E.L., Schoenberg, D.R., 2007. A+U-Rich Instability Elements Differentially Activate 5'-3' and 3'-5' mRNA Decay. *Molecular and Cellular Biology* 27, 2791–2799. doi:10.1128/MCB.01445-06
- Naarmann, I.S., Harnisch, C., Muller-Newen, G., Urlaub, H., Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., 2010. DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA* 16, 2189–2204. doi:10.1261/rna.2211110
- Nagaraj, N., Wisniewski, J.R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Paabo, S., Mann, M., 2014. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Molecular Systems Biology* 7, 548–548. doi:10.1038/msb.2011.81
- Nakamura, Y., Tanaka, K.J., Miyauchi, M., Huang, L., Tsujimoto, M., Matsumoto, K., 2010. Translational repression by the oocyte-specific protein P100 in *Xenopus*. *Developmental Biology* 344, 272–283. doi:10.1016/j.ydbio.2010.05.006
- Niessing, D., Blanke, S., Jäckle, H.J., 2002. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation 16:2576–2582.
- Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., Parker, R., 2010. Decapping Activators in *Saccharomyces cerevisiae* Act by Multiple Mechanisms. *Molecular Cell* 39, 773–783. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.025
- Nonhoff, U., Ralser, M., Welzel, F., Piccini, I., Balzereit, D., Yaspo, M.-L., Lehrach, H., Krobitsch, S., 2007. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6

- and interferes with P-bodies and stress granules. *Molecular biology of the cell* 18, 1385–1396.
- Olsen, P.H., Ambros, V., 1999. 1-s2.0-S0012160699995234-main.pdf. *Developmental Biology* 671–680.
- Ostareck, D.H., Naarmann-de Vries, I.S., Ostareck-Lederer, A., 2014. DDX6 and its orthologs as modulators of cellular and viral RNA expression: Functions of DDX6 and its orthologs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* n/a–n/a. doi:10.1002/wrna.1237
- Ozgur, S., Chekulaeva, M., Stoecklin, G., 2010. Human Pat1b Connects Deadenylation with mRNA Decapping and Controls the Assembly of Processing Bodies. *Molecular and Cellular Biology* 30, 4308–4323. doi:10.1128/MCB.00429-10
- Ozgur, S., Stoecklin, G., 2013. Role of Rck-Pat1b binding in assembly of processing-bodies. *RNA Biology* 10, 528–539. doi:10.4161/rna.24086
- Pacheco, A., Martinez-Salas, E., 2010. Insights into the Biology of IRES Elements through Riboproteomic Approaches. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 1–12. doi:10.1155/2010/458927
- Park, E.-H., Zhang, F., Warringer, J., Sunnerhagen, P., Hinnebusch, A.G., 2011. Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide. *BMC genomics* 12, 68.
- Parker, R., 2012. RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 671–702. doi:10.1534/genetics.111.137265
- Pedro-Segura, E., Vergara, S.V., Rodriguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D.J., Puig, S., 2008. The Cth2 ARE-binding Protein Recruits the Dhh1 Helicase to Promote the Decay of Succinate Dehydrogenase SDH4 mRNA in Response to Iron Deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 283, 28527–28535. doi:10.1074/jbc.M804910200
- Pelletier, J., Sonenberg, N., 1988. Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *Journal of virology* 63, 441–444.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & development* 16, 2906–2922.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., Hellen, C.U., 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332–335.

- Pisarev, A.V., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2007. Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes. *Cell* 131, 286–299. doi:10.1016/j.cell.2007.08.041
- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2010. The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling. *Molecular Cell* 37, 196–210. doi:10.1016/j.molcel.2009.12.034
- Proudfoot, N., O’Sullivan, J., 2002. Polyadenylation: a tail of two complexes. *Current biology* 12, R855–R857.
- Qi, M.-Y., Wang, Z.-Z., Zhang, Z., Shao, Q., Zeng, A., Li, X.-Q., Li, W.-Q., Wang, C., Tian, F.-J., Li, Q., Zou, J., Qin, Y.-W., Brewer, G., Huang, S., Jing, Q., 2012. AU-Rich-Element-Dependent Translation Repression Requires the Cooperation of Tristetraprolin and RCK/P54. *Molecular and Cellular Biology* 32, 913–928. doi:10.1128/MCB.05340-11
- Rabani, M., Levin, J.Z., Fan, L., Adiconis, X., Raychowdhury, R., Garber, M., Gnirke, A., Nusbaum, C., Hacohen, N., Friedman, N., Amit, I., Regev, A., 2011. Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 29, 436–442. doi:10.1038/nbt.1861
- Rajgor, D., Mellad, J.A., Soong, D., Rattner, J.B., Fritzler, M.J., Shanahan, C.M., 2014. Mammalian microtubule P-body dynamics are mediated by nesprin-1. *The Journal of Cell Biology* 205, 457–475. doi:10.1083/jcb.201306076
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 23–36. doi:10.1038/nrm2085
- Rehwinkel, J., 2005. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11, 1640–1647. doi:10.1261/rna.2191905
- Reijns, M.A.M., Alexander, R.D., Spiller, M.P., Beggs, J.D., 2008. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *Journal of Cell Science* 121, 2463–2472. doi:10.1242/jcs.024976
- Richter, J.D., Sonenberg, N., 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477–480.

- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Séraphin, B., 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17, 1030–1032.
- Rouya, C., Siddiqui, N., Morita, M., Duchaine, T.F., Fabian, M.R., Sonenberg, N., 2014. Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1.
- Rozovsky, N., Butterworth, A.C., Moore, M.J., 2008. Interactions between eIF4AI and its accessory factors eIF4B and eIF4H. *RNA* 14, 2136–2148. doi:10.1261/rna.1049608
- Saulière, J., Murigneux, V., Wang, Z., Marquet, E., Barbosa, I., Le Tonquèze, O., Audic, Y., Paillard, L., Roest Crollius, H., Le Hir, H., 2012. CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1124–1131. doi:10.1038/nsmb.2420
- Scheckel, C., Gaidatzis, D., Wright, J.E., Ciosk, R., 2012. Genome-Wide Analysis of GLD-1–Mediated mRNA Regulation Suggests a Role in mRNA Storage. *PLoS Genetics* 8, e1002742. doi:10.1371/journal.pgen.1002742
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., Selbach, M., 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342. doi:10.1038/nature10098
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N., 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63. doi:10.1038/nature07228
- Sen, G.L., Blau, H.M., 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology* 7, 633–636. doi:10.1038/ncb1265
- Serman, A., Le Roy, F., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., Weil, D., 2007. GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Research* 35, 4715–4727. doi:10.1093/nar/gkm491
- Sharif, H., Ozgur, S., Sharma, K., Basquin, C., Urlaub, H., Conti, E., 2013a. Structural analysis of the yeast Dhh1-Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions. *Nucleic Acids Research* 41, 8377–8390. doi:10.1093/nar/gkt600

- Sharif, H., Ozgur, S., Sharma, K., Basquin, C., Urlaub, H., Conti, E., 2013b. Structural analysis of the yeast Dhh1-Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions. *Nucleic Acids Research* 41, 8377–8390. doi:10.1093/nar/gkt600
- She, M., Decker, C.J., Svergun, D.I., Round, A., Chen, N., Muhlrads, D., Parker, R., Song, H., 2008. Structural Basis of Dcp2 Recognition and Activation by Dcp1. *Molecular Cell* 29, 337–349. doi:10.1016/j.molcel.2008.01.002
- Sheth, U., Parker, R., 2003a. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.
- Sheth, U., Parker, R., 2003b. Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* 300, 805–808. doi:10.1126/science.1082320
- Shi, H., Cordin, O., Minder, C.M., Linder, P., Xu, R.-M., 2004. Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17628–17633.
- Singh, G., Pratt, G., Yeo, G.W., Moore, M.J., 2015. The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annual Review of Biochemistry* 84, 150317182619002. doi:10.1146/annurev-biochem-080111-092106
- Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., Aravin, A.A., 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 246–258. doi:10.1038/nrm3089
- Smillie, D.A., Sommerville, J., 2002. RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *Journal of cell science* 115, 395–407.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136, 731–745. doi:10.1016/j.cell.2009.01.042
- Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., Weil, D., 2009. Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *Journal of Cell Science* 122, 3619–3626. doi:10.1242/jcs.054437
- Spahn, C.M., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R.A., Sarnow, P., Frank, J., 2004. Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* 118, 465–475.

- Standart, N., Minshall, N., 2008. Translational control in early development: CPEB, P-bodies and germinal granules. *Biochemical Society Transactions* 36, 671. doi:10.1042/BST0360671
- Stoecklin, G., Anderson, P., 2007. In a tight spot: ARE-mRNAs at processing bodies. *Genes & Development* 21, 627–631. doi:10.1101/gad.1538807
- Stoecklin, G., Mayo, T., Anderson, P., 2006a. ARE-mRNA degradation requires the 5′–3′ decay pathway. *EMBO reports* 7, 72–77. doi:10.1038/sj.embor.7400572
- Stoecklin, G., Mayo, T., Anderson, P., 2006b. ARE-mRNA degradation requires the 5′–3′ decay pathway. *EMBO reports* 7, 72–77. doi:10.1038/sj.embor.7400572
- Story, R.M., Li, H., Abelson, J.N., 2001. Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 1465–1470.
- Sweet, T., Kovalak, C., Collier, J., 2012. The DEAD-box protein Dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. *PLoS Biol.* 10, e1001342. doi:10.1371/journal.pbio.1001342
- Tanaka, K.J., Ogawa, K., Takagi, M., Imamoto, N., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., 2006. RAP55, a Cytoplasmic mRNP Component, Represses Translation in *Xenopus* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry* 281, 40096–40106. doi:10.1074/jbc.M609059200
- Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., Linder, P., 2003. The Q Motif: A Newly Identified Motif in DEAD Box Helicases May Regulate ATP Binding and Hydrolysis.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., Parker, R., 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382. doi:10.1261/rna.7258505
- Tharun, S., Parker, R., 2001. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p–7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Molecular cell* 8, 1075–1083.
- Totaro, A., Renzi, F., La Fata, G., Mattioli, C., Raabe, M., Urlaub, H., Achsel, T., 2011. The human Pat1b protein: a novel mRNA deadenylation factor identified by a new immunoprecipitation technique. *Nucleic Acids Research* 39, 635–647. doi:10.1093/nar/gkq797

- Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.-M., Bertrand, E., Tazi, J., 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of Cell Biology* 160, 823–831. doi:10.1083/jcb.200212128
- Tritschler, F., Braun, J.E., Eulalio, A., Truffault, V., Izaurralde, E., Weichenrieder, O., 2009. Structural Basis for the Mutually Exclusive Anchoring of P Body Components EDC3 and Tral to the DEAD Box Protein DDX6/Me31B. *Molecular Cell* 33, 661–668. doi:10.1016/j.molcel.2009.02.014
- Tritschler, F., Eulalio, A., Helms, S., Schmidt, S., Coles, M., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., Truffault, V., 2008. Similar Modes of Interaction Enable Trailer Hitch and EDC3 To Associate with DCP1 and Me31B in Distinct Protein Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 28, 6695–6708. doi:10.1128/MCB.00759-08
- Tritschler, F., Eulalio, A., Truffault, V., Hartmann, M.D., Helms, S., Schmidt, S., Coles, M., Izaurralde, E., Weichenrieder, O., 2007. A Divergent Sm Fold in EDC3 Proteins Mediates DCP1 Binding and P-Body Targeting. *Molecular and Cellular Biology* 27, 8600–8611. doi:10.1128/MCB.01506-07
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D., Parker, R., 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., Parker, R., 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377–386.
- Uchida, N., Hoshino, S. -i., Katada, T., 2004. Identification of a Human Cytoplasmic Poly(A) Nuclease Complex Stimulated by Poly(A)-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279, 1383–1391. doi:10.1074/jbc.M309125200
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., others, 2000. A comprehensive analysis of protein–protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623–627.
- Ulbricht, R.J., Olivas, W.M., 2007. Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability. *RNA* 14, 246–262. doi:10.1261/rna.847408
- Unterholzner, L., Izaurralde, E., 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Molecular cell* 16, 587–596.

- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., Séraphin, B., 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *The EMBO journal* 21, 6915–6924.
- Vassilenko, K.S., Alekhina, O.M., Dmitriev, S.E., Shatsky, I.N., Spirin, A.S., 2011. Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Research* 39, 5555–5567. doi:10.1093/nar/gkr147
- Virtanen, A., Henriksson, N., Nilsson, P., Nissbeck, M., 2013. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN): An allosterically regulated, processive and mRNA cap-interacting deadenylase. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 48, 192–209. doi:10.3109/10409238.2013.771132
- Wang, X.-P., Cooper, N.G., 2010. Comparative in silico analyses of cpeb1–4 with functional predictions. *Bioinformatics and biology insights* 4, 61.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B., 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular cell* 2, 135–140.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., Weil, D., 2005. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *Journal of Cell Science* 118, 981–992. doi:10.1242/jcs.01692
- Wilkie, G.S., Gautier, P., Lawson, D., Gray, N.K., 2005. Embryonic Poly(A)-Binding Protein Stimulates Translation in Germ Cells. *Molecular and Cellular Biology* 25, 2060–2071. doi:10.1128/MCB.25.5.2060-2071.2005
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature* 228–234.
- Wyers, F., Minet, M., Dufour, M.E., Vo, L.T.A., Lacroute, F., 2000. mb003538.pdf 3538–3549.
- Yang, W.-H., Yu, J.H., Gulick, T., Boch, K.D., Bloch, D.B., 2006. RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* 12, 547–554. doi:10.1261/rna.2302706
- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathiou, T., Rubin, R., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2004. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *Journal of Cell Science* 117, 5567–5578. doi:10.1242/jcs.01477

- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathiou, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2004. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *Journal of Cell Science* 117, 5567–5578. doi:10.1242/jcs.01477
- Yu, D., Tan, A.H.-M., Hu, X., Athanasopoulos, V., Simpson, N., Silva, D.G., Hutloff, A., Giles, K.M., Leedman, P.J., Lam, K.P., Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., 2007. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* 450, 299–303. doi:10.1038/nature06253
- Yu, J.H., Yang, W., Gulick, T., Boch, K.D., Bloch, D.B., 2005. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body 1795–1802.
- Zähringer, J., Baliga, B.S., Munro, H.N., 1976. Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 857–861.
- Zhao, R., Shen, J., Green, M.R., MacMorris, M., Blumenthal, T., 2004. Crystal Structure of UAP56, a DExD/H-Box Protein Involved in Pre-mRNA Splicing and mRNA Export. *Structure* 12, 1373–1381. doi:10.1016/j.str.2004.06.006
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., Shyu, A.-B., 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 182, 89–101. doi:10.1083/jcb.200801196

Annexes

Annexe 1 : article

P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes

Jessica Ayache^{a,*}, Marianne Bénard^{a,*}, Michèle Ernoul-Lange^a, Nicola Minshall^b, Nancy Standart^b, Michel Kress^a, and Dominique Weil^a

^aUPMC Université de Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine, CNRS UMR-7622, F-75005 Paris, France; ^bDepartment of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QW, United Kingdom

ABSTRACT P-bodies are cytoplasmic ribonucleoprotein granules involved in posttranscriptional regulation. DDX6 is a key component of their assembly in human cells. This DEAD-box RNA helicase is known to be associated with various complexes, including the decapping complex, the CPEB repression complex, RISC, and the CCR4/NOT complex. To understand which DDX6 complexes are required for P-body assembly, we analyzed the DDX6 interactome using the tandem-affinity purification methodology coupled to mass spectrometry. Three complexes were prominent: the decapping complex, a CPEB-like complex, and an Ataxin2/Ataxin2L complex. The exon junction complex was also found, suggesting DDX6 binding to newly exported mRNAs. Finally, some DDX6 was associated with polysomes, as previously reported in yeast. Despite its high enrichment in P-bodies, most DDX6 is localized out of P-bodies. Of the three complexes, only the decapping and CPEB-like complexes were recruited into P-bodies. Investigation of P-body assembly in various conditions allowed us to distinguish required proteins from those that are dispensable or participate only in specific conditions. Three proteins were required in all tested conditions: DDX6, 4E-T, and LSM14A. These results reveal the variety of pathways of P-body assembly, which all nevertheless share three key factors connecting P-body assembly to repression.

Monitoring Editor

A. Gregory Matera
University of North Carolina

Received: Mar 10, 2015

Revised: May 13, 2015

Accepted: May 13, 2015

INTRODUCTION

Protein production in the cytoplasm of eukaryotic cells depends on the balance between translation, storage, and degradation of mRNAs. Although it has only been recognized lately, posttranscriptional regulation appears critical for the control of gene expression. Strikingly, the first genome-scale prediction of synthesis rates of mRNAs and proteins in mammalian cells showed that the abundance

of proteins is predominantly controlled at the level of translation (Schwanhäusser *et al.*, 2011). Studies of mature oocytes and fertilized eggs, which rely on translational regulation because their transcription is shut down, led to the identification of several important factors, including the well-characterized CPEB complex (Minshall *et al.*, 2007). Other cells also control expression posttranscriptionally, as illustrated by local translation in dendrites and axons, which involves some of the factors identified in early development, as well as neuron-specific ones (Holt and Schuman, 2013). More generally, the recently discovered RNA interference (RNAi) pathway is a major pathway that controls mRNA translation and stability by a mechanism involving the microRNA (miRNA)-associated RISC complex. Remarkably, many factors involved in these various processes accumulate in cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) granules, called P-bodies in somatic cells, along with the 5' to 3' mRNA degradation machinery (Buchan, 2014). P-bodies, which are conserved in all eukaryotes, vegetal and animal, are thought to play a role in mRNA degradation and/or storage, though overall their function remains elusive.

Several P-body proteins were shown to influence P-body number in mammalian cells, as their silencing led to the reduction or the

This article was published online ahead of print in MBc in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E15-03-0136>) on May 20, 2015.

*Co-first authors.

Address correspondence to: Dominique Weil (dominique.weil@upmc.fr).

Abbreviations used: DTT, dithiothreitol; EJC, exon junction complex; HA, hemagglutinin; LC-MS/MS, liquid chromatography–tandem mass spectrometry; miRNA, microRNA; PBS, phosphate-buffered saline; RNAi, RNA interference; siRNA, small interfering RNA; TAP-tag, tandem-affinity purification.

© 2015 Ayache, Bénard, *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

"ASCB," "The American Society for Cell Biology," and "Molecular Biology of the Cell" are registered trademarks of The American Society for Cell Biology.

disappearance of P-bodies. This includes GW182 (Yang et al., 2004), LSM1, DDX6, 4E-T (Andrei et al., 2005), EDC4 (Yu et al., 2005), LSM14A (Yang et al., 2006), CPEB1 (Wilczynska et al., 2005), and PAT1B (Marnef et al., 2010; Ozgur et al., 2010). This suggested that each of these proteins is required for P-body assembly. Regarding GW182 and CPEB1, we showed that P-bodies could nevertheless be robustly re-induced in their absence, by incubating cells briefly with arsenite, indicating that P-body assembly is a more complex process than anticipated (Serman et al., 2007). DDX6 was unique, in that arsenite could not induce any P-bodies in DDX6-depleted cells. We therefore focused on this RNA helicase as a key protein in the assembly process.

DDX6 (called RCK/p54 in humans, Me31B in *Drosophila*, CGH1 in *Caenorhabditis elegans*, Dhh1 in yeast) was initially described in two main types of complexes: the decapping complex and the CPEB1 translation-repression complex. Its involvement in 5' cap removal has been mostly studied in yeast, where DDX6 coimmunoprecipitated with several decapping proteins, including DCP1, LSM1, and PAT1 (Coller et al., 2001). Moreover, DDX6 deletion led to the increased half-life of reporter mRNAs and to the accumulation of full-length deadenylated mRNAs. Similar interactions were then reported in *Drosophila* cells (Haas et al., 2010). Finally, a direct interaction of DDX6 with PAT1B and EDC3 was demonstrated by cocrystallization (Tritschler et al., 2009; Sharif et al., 2013).

The CPEB1 complex was characterized in detail in *Xenopus*, where it is required for the repression of maternal mRNAs. In oocytes, DDX6 coimmunoprecipitated and copurified in gel-filtration fractions with CPEB1 and associated proteins, including 4E-T, Pat1a, Lsm14B, and eIF4E1b, as well as ePAB (Minshall et al., 2007, 2009). Moreover, tethering DDX6 to reporter mRNAs repressed their translation (Minshall et al., 2009). In yeast, where CPEB is absent, DDX6 deletion prevented the general translational repression that is observed after glucose deprivation (Holmes et al., 2004). On the other hand, DDX6 overexpression led to general translational repression even in rich medium (Coller and Parker, 2005). Similarly, in human cells, DDX6 silencing stimulated cellular translation (Chu and Rana, 2006). Furthermore, DDX6 interacted with proteins of the RISC complex, including AGO1 and AGO2. Specific reporters of small interfering RNA (siRNA)- and miRNA-driven silencing suggested that DDX6 participated in the miRNA but not the siRNA pathway (Chu and Rana, 2006). Recently DDX6 was shown to interact directly with the CCR4/NOT complex, which deadenylates mRNAs before decapping. Moreover, a NOT1 peptide activated the ATPase activity of DDX6, which otherwise is undetectable (Mathys et al., 2014), and mutations abolishing DDX6 NOT1 binding prevented repression of miRNA reporters (Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014; Rouya et al., 2014).

While DDX6 is essential for human P-body assembly (Serman et al., 2007; Minshall et al., 2009), there is so far no insight into which of its numerous functions is involved. The relative abundance of the various DDX6 complexes described above is not even known. The first question was therefore which of them, or another yet to be identified, was predominant in human epithelial cells. To address this, we undertook the identification of the DDX6 interactome in human cells using a tandem-affinity purification (TAP-tag) strategy coupled to mass spectrometry analysis. The top partners included the decapping complex, a CPEB-like complex, and an Ataxin2/Ataxin2L (ATXN2/ATXN2L) complex. On the basis of silencing experiments, we showed that translational repression complexes were central to P-body assembly, rather than decay or ATXN2/ATXN2L complexes.

RESULTS

Identification of the main DDX6 complexes

To identify the main complexes containing DDX6 in human somatic cells, we purified them from the epithelial cell line HEK293 by TAP-tag. Briefly, a plasmid encoding DDX6 fused to FLAG and hemagglutinin (HA) tags was transiently transfected into these cells. After 48 h, the tagged protein was expressed at similar levels and with a similar P-body localization and enrichment as the endogenous one, as indicated by Western blot and immunofluorescence analysis, respectively (Figure 1, A–C). It is important to note, as reported previously, that although DDX6 is highly enriched in P-bodies, most DDX6 protein is nevertheless localized out of P-bodies. Indeed, an accurate quantification of DDX6 distribution in HeLa cell thin sections in immunoelectron microscopy previously demonstrated that endogenous DDX6 is enriched 170-fold in P-bodies with respect to the surrounding cytoplasm (Ernault-Lange et al., 2012). Taking into account their size, this means that, in a cell with five P-bodies, 94% of DDX6 is excluded from P-bodies. Although we did not perform such extensive quantification in HEK293 cells, our estimate is of the same order. Indeed, DDX6 is similarly concentrated in P-bodies, as observed in immunoelectron microscopy (Figure 1D), and P-bodies are often larger (650-nm vs. 500-nm diameter) but less numerous (two per cell vs. five) than in HeLa cells.

Cytoplasmic lysates were prepared from 2×10^8 cells, and DDX6 RNP complexes were successively purified on FLAG and HA affinity resins. As a control, the same procedure was applied to cells transfected with an empty vector. An aliquot of the resulting proteins was separated in denaturing SDS–PAGE and stained with silver to visualize the quality of the purification (Figure 1E, left panel). The tagged DDX6 specifically copurified with a large number of proteins, as expected for a protein involved in a variety of RNP complexes. The experiment was repeated after treatment of the cytoplasmic lysate with RNase A to identify proteins that interact with DDX6 independently of RNA. The silver staining pattern remained highly complex after RNA digestion (Figure 1E, right panel). Complexes purified from both untreated and RNase-treated lysates and from control lysates were then analyzed by mass spectrometry to identify their protein content.

Without considering potential alternative isoforms, 367 and 323 proteins were specifically identified in untreated and RNase-treated DDX6 complexes compared with control lysates (Figure 2A, left panel, and Supplemental Table 1), and the two lists were limited to 299 and 233 proteins represented by at least two peptides, respectively. Based on Gene Ontology (GO) annotation, the vast majority of these were involved in RNA metabolism (GO 0003723): 226 and 112 proteins in untreated and RNase-treated lysates, respectively (GO p values = 10^{-197} and 10^{-64}). Based on the literature, proteins were then manually annotated as involved in RNA or DNA metabolism, cytoskeleton, or mitochondria, and ranked by Mascot scores (Figure 2A, right panel). The low level of cytoskeletal and mitochondrial proteins confirmed the quality of the purification. Manual annotation and GO analysis indicated that even proteins with the lowest Mascot scores should be considered, as they were highly enriched for proteins involved in RNA metabolism (GO p values = 10^{-33} and 10^{-11} , for untreated and RNase-treated lysates, respectively; Figure 2B). Compared with untreated lysates, RNase treatment severely decreased the number of proteins with high and middle Mascot scores (Figure 2A, left panel).

To further refine the functional description of DDX6 partners, we subclassified proteins involved in RNA metabolism into categories of mRNA decay, mRNA repression or localization, cap or poly(A)-binding proteins, ribosomal proteins, translation initiation

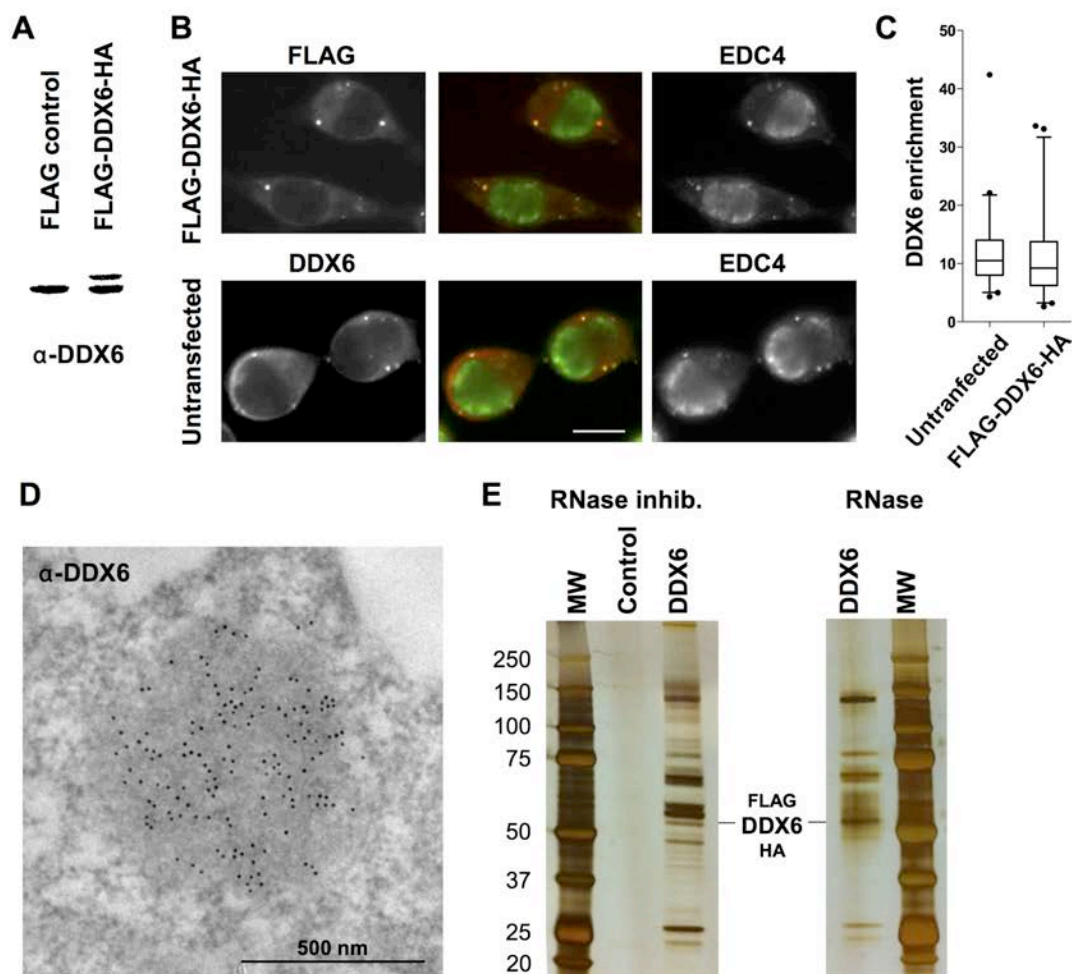


FIGURE 1: Purification of DDX6 complexes by TAP-tag. (A) HEK293 cells were transfected with a FLAG-DDX6-HA or an empty plasmid as a control. After 48 h, proteins were analyzed by Western blotting with anti-DDX6 antibodies. (B) In parallel, transfected cells were stained with anti-FLAG (red) and anti-EDC4 (green) antibodies to detect the exogenous DDX6 protein and P-bodies, respectively. For comparison, untransfected cells were stained with anti-DDX6 and anti-EDC4 antibodies. Owing to the round shape of the cells, the maximal projection of a z-series of images is shown to better visualize P-bodies. Scale bar: 10 μ m. (C) DDX6 enrichment in P-bodies with respect to the surrounding cytoplasm ($n = 94$ and 90 for transfected and untransfected samples, respectively) was quantified from single-plane images. (D) Endogenous DDX6 was detected in untransfected HEK293 cells by immunoelectron microscopy, as previously described (Souquere *et al.*, 2009). One P-body highly enriched in DDX6 is shown. (E) Cells transfected with a FLAG-DDX6-HA or an empty plasmid were lysed in the presence of RNase inhibitor or RNase, and DDX6 complexes were purified by TAP-tag. Proteins were migrated on a denaturing gel along with a molecular weight marker (MW) and silver stained.

or elongation factors, and splicing, based on the literature (Figure 2C). Even though arbitrary choices had to be made for proteins which were involved in several pathways, in particular to distinguish decapping activators and translational repressors as detailed in the introduction, it indicated three major classes of partners in terms of enrichment: decay factors, repression/localisation factors, and ribosomal proteins. Among the three, ribosomal proteins were the most affected by RNase treatment.

DDX6 in mRNA-decay complexes

Overall 28 DDX6 partners were classified in mRNA decay: 27 were present in untreated lysates (21 with scores > 160), and 17 in RNase-treated lysates (12 with scores > 160). While Mascot scores do not faithfully reflect protein abundance, we considered that the top list was likely to contain at least some components of the most abundant DDX6 complexes. In fact, four proteins of the mRNA decapping complex were present in the top 20 partners: EDC4, EDC3,

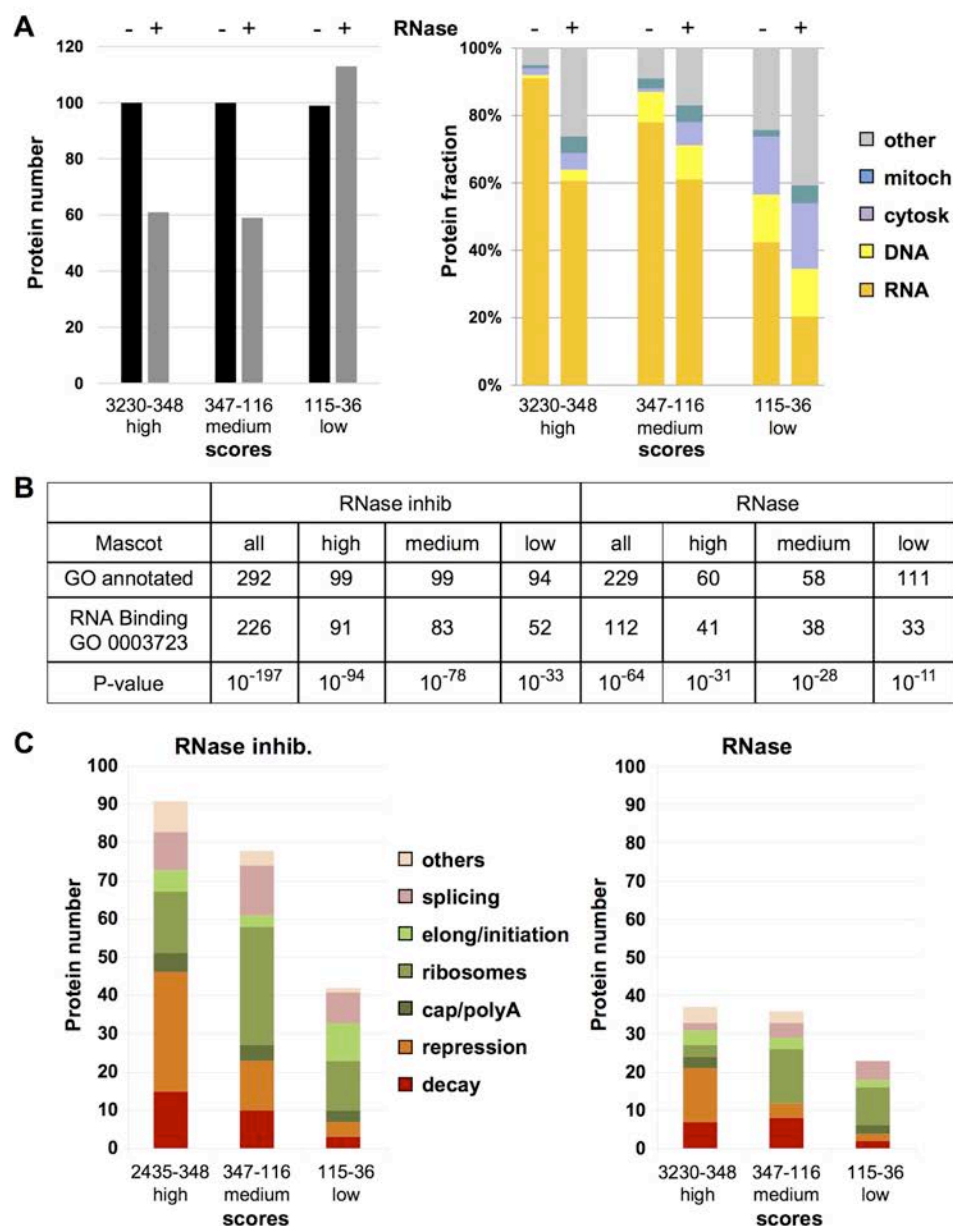


FIGURE 2: Functional description of the proteins identified by mass spectrometry. (A) Proteins purified from lysates treated with RNase inhibitor (– RNase) or RNase (+ RNase) were ranked by Mascot score and arbitrarily divided into three groups of high, medium, and low scores, as shown in the left panel. Their distribution into functional categories is based on the literature, and shown in the right panel. (B) RNA-binding proteins were searched using gene ontology. The table presents for each group (all, high, medium, low Mascot scores), the number of proteins annotated in the GO database (GO annotated), the number of RNA-binding annotated proteins (GO 0003723), and the *p* value associated with their enrichment. (C) Proteins categorized in RNA metabolism in A were subcategorized into indicated functions based on the literature.

DCP1A, and DCP1B (Table 1). Furthermore, all other components were present further down the list: XRN1, DCP2, and LSM1-7 (except LSM5; Table 2). XRN2 was also present, though with a lower

score than XRN1. In contrast, proteins of the 3' to 5' mRNA degradation pathway were almost absent, whether components of the exosome or of the CCR4-NOT complex (Table 2). Similarly, apart

	Untreated		RNase treated		Function
	Score	Peptides	Score	Peptides	
ATXN2L	2305	44	3230	53	Repression
ATXN2	2127	37	3047	52	Repression
EDC4	1043	25	2904	46	Decapping
PABPC4	2360	39	2603	38	Poly(A)-binding
UPF1	2435	50	125	3	NMD
PABPC1	2359	39	2431	39	Poly(A)-binding
4E-T	2325	41	646	12	Repression
HSPA1A	1807	31	2255	32	Chaperone
DCP1A	1974	31	2243	29	Decapping
EDC3	2194	36	2235	33	Decapping
DHX30	2205	44	–	–	?
NUFIP2	1698	27	2165	28	Repression
PATL1	2083	36	1490	26	Repression
DDX6	2079	34	1991	25	
DCP1B	1807	28	2067	31	Decapping
DHX9	2032	41	–	–	Repression
HELZ	–	–	2022	39	Translation
GIGYF2	224	6	1870	37	Repression
HSPA8	1356	23	1836	29	Chaperone
LSM14B	1811	27	1709	25	Repression
LARP1	1446	30	1766	36	Translation
HSPA9	857	13	1766	30	Chaperone
MOV10	1658	32	168	4	Repression
YTHDC2	1611	36	29	1	?
LSM14A	1578	29	1342	25	Repression
PRMT5	544	13	1531	27	PTM
G3BP2	955	18	1417	22	?

The 20 proteins with highest Mascot scores in either untreated or RNase-treated lysates are listed. The indicated function is based on the literature. Note that some of the proteins classified in translational repression are also decapping activators. NMD: Nonsense-mediated decay; PTM: posttranslational modification.

TABLE 1: Top DDX6 partners.

from UPF1, which was abundantly present in untreated lysates, proteins of the nonsense-mediated decay pathway were almost absent (Table 2).

To circumvent potential artificial interactions resulting from transgene expression, we then performed DDX6 immunoprecipitation experiments using untransfected cells (Figure 3A). Anti-DDX6 antibodies coimmunoprecipitated EDC3, EDC4, DCP1A, and XRN1 efficiently in the presence or absence of RNase, though to various extents. The data were then quantitated to estimate the fraction of these proteins associated with DDX6. While weak coimmunoprecipitations are inconclusive, as the interactions could be lost during purification, efficient ones should reveal proteins that are mostly bound to DDX6. Strikingly, a major fraction of the EDC3 and DCP1A pools, but little EDC4, was associated with endogenous DDX6 in an RNA-independent manner. RNA digestion reproducibly enhanced EDC4 interaction, possibly due to an increased accessibility of the DDX6 epitope in the absence of RNA. Only the interaction with XRN1 was partly mediated by RNA. In agreement with previous reports, these four proteins were strongly enriched in P-bodies, with

nevertheless some signal in the cytosol, as for DDX6 (Supplemental Figure 1A).

DDX6 in translational repression complexes

Overall 50 DDX6 partners were classified in mRNA repression and/or localization: 48 were present in untreated lysates (41 with scores > 160) and 20 in RNase-treated lysates (17 with scores > 160). Four proteins characteristic of the CPEB1 complex were present in the top 20 list: 4E-T, PAT1B, LSM14A, and LSM14B (Table 1). Nevertheless, CPEB1 itself was not detected, possibly reflecting its relatively low abundance in HEK293 cells. We will therefore refer to this complex as the CPEB-like complex hereafter. The top list also included NUFIP2, which binds FMRP. Besides FMRP itself, other FMRP-associated proteins were present lower down the list, including FXR1 and FXR2 (Table 2). Finally, there were two eIF4E-binding proteins, 4E-T (also in the CPEB1 complex; Kamenska *et al.*, 2014) which interacts with both eIF4E1 and eIF4E2, and GIGYF2 specific to eIF4E2 (Morita *et al.*, 2012). Consistent with DDX6 association with repressed mRNAs, most translation initiation factors were absent. The

		Untreated		RNase treated		Pathway/complex
		Score	Peptides	Score	Peptides	
mRNA decay	DCP1A	1974	31	2243	29	5', 3' mRNA decay
	DCP1B	1807	28	2067	31	
	EDC3	2194	36	2235	33	
	EDC4	1043	25	2904	46	
	XRN1	851	22	316	8	3', 5' mRNA decay
	XRN2	119	4	–	–	
	DCP2	82	3	298	7	
	LSM1	244	4	153	3	
	LSM2	389	7	325	5	
	LSM3	58	2	34	1	
	LSM4	294	5	214	5	
	LSM6	207	5	158	4	
	LSM7	101	2	111	2	
	CNOT6L	–	–	30	1	
	UPF1	2435	50	125	3	NMD
	UPF3B	39	1	–	–	
	SMG6	149	4	–	–	
	eIF4A3	592	14	–	–	EJC core
	MAGOH	193	5	–	–	
	MLN51	187	4	–	–	
	Y14	77	2	–	–	
Translational repressors	4E-T	2325	41	646	12	CPEB complex
	PAT1B	2083	36	1490	26	
	LSM14B	1811	27	1709	25	
	LSM14A	1578	29	1342	25	
	ATXN2L	2305	44	3230	53	miRNA pathway
	ATXN2	2127	37	3047	52	
	MOV10	1658	32	168	4	
	AGO2	104	3	–	–	
	GIGYF2	224	6	1870	37	eIF4E2-BP
	NUFIP2	1698	27	2165	28	FMRP complex
	FMRP	432	8	–	–	
	FXR2	618	11	–	–	
	FXR1	403	8	–	–	
Miscellaneous	PABPC4	2360	39	2603	38	Poly(A)- binding
	PABPC1	2359	39	2431	39	
	PABPC3	1131	20	1206	21	
	PABPN1	–	–	78	2	
	LSM12	430	7	591	7	ATXN2 associated
	DHX30	2205	44	–	–	
	DHX9	2032	41	–	–	
	HELZ	–	–	2022	39	
	YTHDC2	1611	36	29	1	

TABLE 2: Functional classification of DDX6 partners.

Continues

	Untreated		RNase treated		Pathway/complex
	Score	Peptides	Score	Peptides	
HSPA1A	1807	31	2255	32	Chaperone and regulators
HSPA8	1356	23	1836	29	
HSPA9	857	13	1766	30	
HSPA5	1234	20	1312	21	
HSPH1	–	–	161	4	
BAG4	257	5	406	7	
BAG2	–	–	75	2	
G3BP2	955	18	1417	22	G3BP complex
G3BP1	548	10	809	15	
CAPRIN1	185	3	–	–	
LARP1	1446	30	1766	36	TOP mRNA translation
PRMT5	544	13	1531	27	PTM
NCBP1	1011	17	–	–	Nuclear CBC and associated proteins
NCBP2	237	4	–	–	
DDX3	106	3	–	–	
ZC3H18	192	6	–	–	
ARS2	100	4	–	–	
eIF4E2	112	2	268	7	eIF4F
eIF4E1	181	5	189	3	
eIF4G	43	2	376	11	
eIF4B	38	1	45	1	
eIF4A1	–	–	56	2	

The 20 proteins with highest Mascot scores are in bold.

TABLE 2: Functional classification of DDX6 partners. Continued

only exceptions were the eIF4F components, albeit with medium to low scores. Immunoprecipitation experiments using untransfected cells confirmed the efficient copurification of the major fraction of 4E-T, PAT1B, LSM14A, and LSM14B with DDX6. Contrary to decay factors, all interactions were partly sensitive to RNase treatment (Figure 3B). In immunofluorescence, the five proteins were strongly enriched in P-bodies (Supplemental Figure 1B). In contrast, only a minor fraction of eIF4E1 coprecipitated with DDX6, and eIF4E1 was modestly enriched in P-bodies, which is consistent with its main role in active translation initiation.

Surprisingly, a large number of ribosomal proteins were also specifically present in DDX6 complexes (Figure 2C). Although ribosomal proteins are common contaminants of purified complexes, they were unexpected at such levels. Indeed, 58 proteins of the 40S and 60S subunits were present, including 32 with Mascot scores above 160. RNase treatment strongly decreased both their number and abundance: 36 proteins were left, including only six with scores above 160, without bias toward 40S or 60S subunits. We therefore analyzed the distribution of endogenous DDX6 in polysomes using sucrose gradients (Figure 3C, top panel). While a large part of the protein was present in subpolysomal fractions, some was spread across the entire gradient. For ensuring that these heavy complexes were polysomes, cells were incubated with cycloheximide for 30 min before lysis to specifically accumulate polysomes (Figure 3C, bot-

tom panel). The amount of DDX6 increased in the heavy fractions, confirming that a fraction of DDX6 was associated with polysomes.

DDX6 in ATXN2 and ATXN2L complexes

Interestingly, both ATXN2 and ATXN2L were in the top 20 proteins interacting with DDX6 (Table 1). These related proteins contain an LSM domain. They were shown to interact together and with PABP, and ATXN2 also interacts with LSM12 (Nonhoff *et al.*, 2007; Kaehler *et al.*, 2012). In fact, PABPC1 and PABPC4 were also in the top list, while PABPC3 and LSM12 were present further down the list (Table 2). ATXN2 is functionally required for miRNA function in *Drosophila* cells (McCann *et al.*, 2011). A second regulator of the miRNA pathway, MOV10, was also in the top 20 list (Table 1; Liu *et al.*, 2012). Nevertheless, with the exception of a small amount of AGO2, core proteins of the RISC complex were absent, including TNRC6A, 6B, and 6C and AGO1, -3, and -4 proteins. DDX6 interaction with ATXN2, ATXN2L, PABPC1, and LSM12 was confirmed in untransfected cells by coimmunoprecipitation (Figure 4A). It was fully resistant to RNase, except for LSM12 which was partly RNA-mediated. RNA digestion reproducibly enhanced PABPC1 interaction, as observed for EDC4. In contrast to proteins of the decapping and CPEB1 complexes, none of these proteins localized to P-bodies (Supplemental Figure 1C). Therefore DDX6 participates in at least three major complexes: the decapping complex and the repression

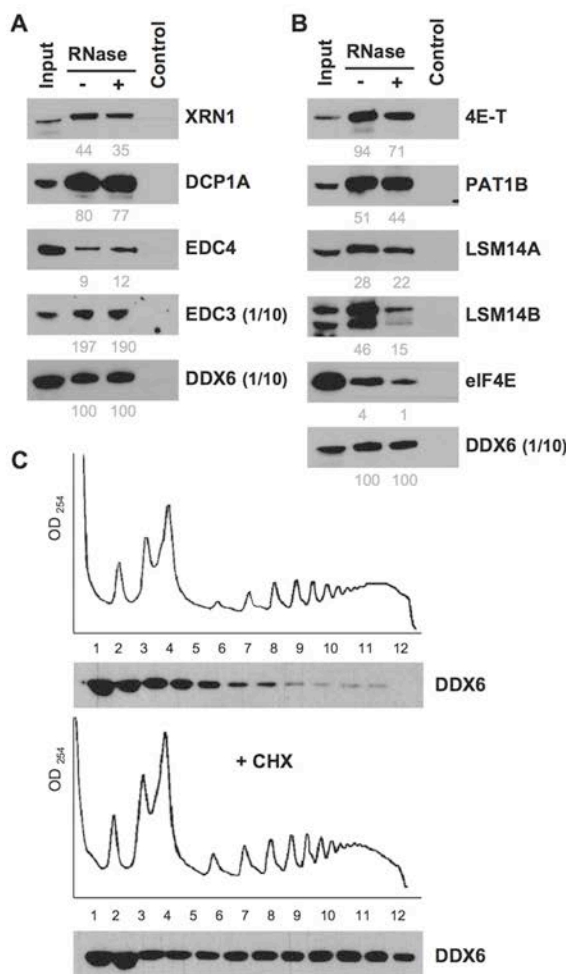


FIGURE 3: Characterization of decay and repression complexes in untransfected cells. (A and B) HEK293 cytoplasmic lysates were immunoprecipitated with anti-DDX6 antibodies and analyzed by Western blotting for components of (A) decapping and (B) repression complexes, as indicated. For DDX6 and EDC3, only one-tenth of the immunoprecipitate was loaded on the gel to avoid saturation. For facilitation of comparison, the immunoprecipitation efficiency was estimated from scanned images, as described in *Materials and Methods*, and indicated below as percent values. (C) Cytoplasmic lysates from HEK293 incubated or not with cycloheximide (+ CHX) were separated by centrifugation on sucrose gradients and analyzed by optical densitometry (top panels). Proteins from collected fractions were analyzed by Western blotting with anti-DDX6 antibodies (bottom panels).

complex, both of which can be recruited into P-bodies, and an ATXN2/ATXN2L complex, which is excluded from P-bodies.

In stress conditions, ATXN2 and ATXN2L are recruited with repressed mRNAs into a distinct type of granule, called stress granules (Nonhoff et al., 2007; Kaehler et al., 2012). As some DDX6 also relocates to stress granules, we investigated whether their recruitment could be coordinated. For this experiment, we used HeLa cells, which are flatter than HEK293 cells and thus more appropriate for

cell imaging. Cells were transfected with siRNAs targeting ATXN2 or ATXN2L, and after 48 h, stress granules were induced with arsenite. The silencing was efficient, as verified by immunostaining of ATXN2 and ATXN2L (unpublished data). In control cells, ATXN2 and ATXN2L were recruited in stress granules, as expected, while DDX6 was found in both P-bodies and stress granules (Figure 4B). Similar results were observed following ATXN2 silencing. However, when ATXN2L was depleted, DDX6 was exclusively localized in P-bodies. These results supported the DDX6-ATXN2L interaction *in vivo* and unexpectedly showed that ATXN2L is required for the recruitment of DDX6 to stress granules.

DDX6 complexes in oocytes

To evaluate cell-specific variations of DDX6 complexes, we conducted a similar experiment in *Xenopus* oocytes. Several hundred stage VI oocytes were injected with *in vitro* transcribed RNA encoding FLAG-MS2-tagged DDX6 or tags alone. After 48 h, DDX6 RNP complexes were immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies, and proteins were identified by mass spectrometry (Supplemental Table 2). Among the 27 proteins specifically present in oocytes, 19 were directly related to mRNA metabolism. From these, 14 were also found in HEK293 cells, either identically or in their somatic version. Among the five absent proteins, some were in fact oocyte specific (Zar1, Zar2, CPEB1). In a second experiment, oocytes were matured by treatment with progesterone before DDX6 RNP purification (Supplemental Table 2). Of the 24 proteins identified, 20 were related to mRNA metabolism, and 16 of these were also found in HEK293 cells.

In the two experiments, the highest Mascot scores were found for proteins involved in translational repression, while proteins involved in decapping came second. The top repressive proteins were components of the CPEB1 complex, including Lsm14B, Pat1a, and 4E-T. In oocytes, the decapping complex was only partially represented, with most proteins of the Lsm1-7 complex, but neither Dcp1a, Dcp1b, Dcp2 proteins nor Edc4. Edc3 was only detected after progesterone treatment. Instead, a distinct decapping enzyme, Nudt16, was present (Ghosh et al., 2004). As quantitative proteomic analysis indicates that Dcp1a, Dcp1b, and Edc4 are nevertheless expressed in *Xenopus* eggs as in human epithelial cells (Supplemental Table 2; Nagaraj et al., 2011; Wühr et al., 2014), these results raise the possibility that DDX6 participates in a different decapping complex in oocytes compared with epithelial cells. Finally, there was no evidence of any Atxn2 or Atxn2L complex, and Pabps were also absent (Supplemental Table 2). Again, these proteins are nevertheless expressed, at least in eggs. Thus, while DDX6 partners have similar types of function in oocytes and in epithelial cells, there are important cell-specific variations, which include in particular the nature of the decapping complex and the ATXN2/2L complex.

DDX6 complexes and EJC

DDX6 is a cytoplasmic protein, and the TAP-tag experiment was performed with cytoplasmic extracts of HEK293 cells. Surprisingly, the four core proteins of the EJC (exon junction complex) were found: eIF4A3, MLN51, MAGOH, and Y14 (Table 2). The EJC is thought to be removed in the cytoplasm at the first round of translation, upon ribosome scanning. A second concurrent event is the replacement of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1 by its cytoplasmic counterparts PABPC1-4, and the replacement of the nuclear cap-binding complex NCBP1/NCBP2 by its cytoplasmic counterpart eIF4E1 or eIF4E2. Strikingly, while a small amount of PABPN1 was detected, both NCBP1 and NCBP2 were present with scores that were even higher than the eIF4E1 and eIF4E2 proteins.

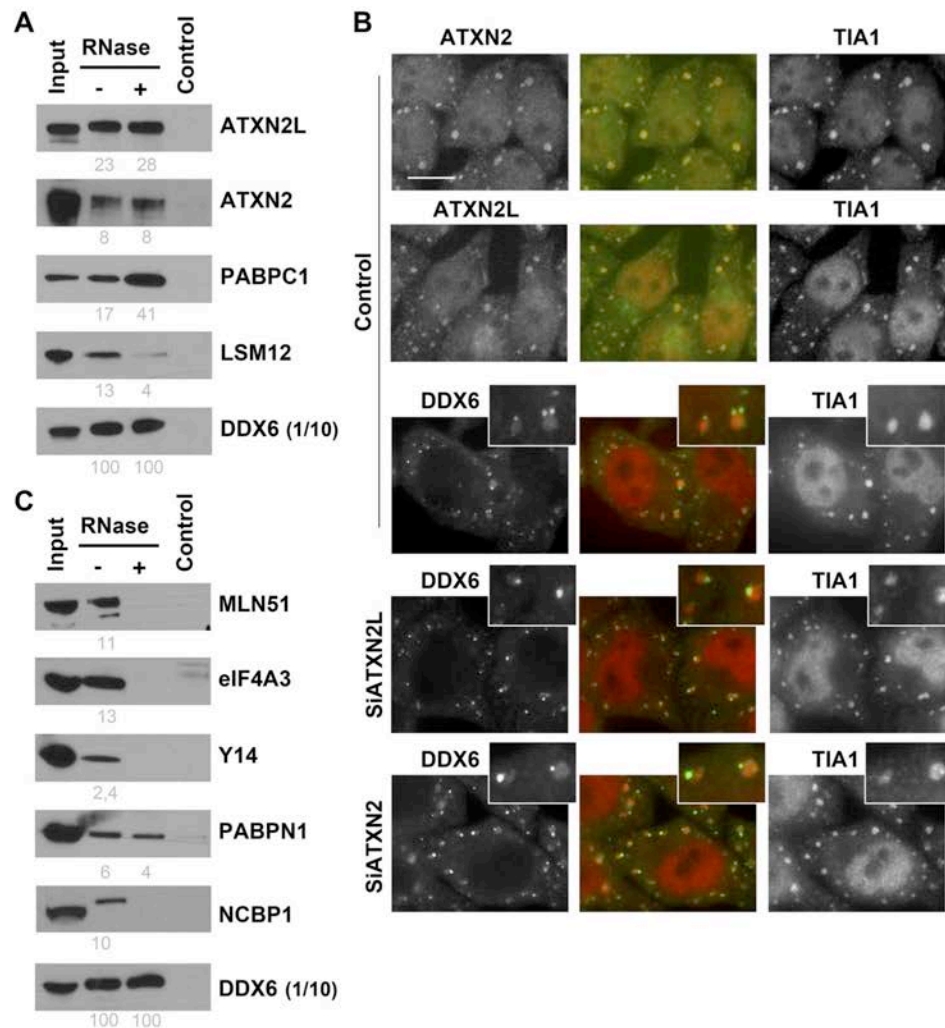


FIGURE 4: Characterization of the ATXN2/2L complex and EJC in untransfected cells. (A) Components of the ATXN2/2L complex were analyzed as in Figure 3, A and B. (B) HeLa cells were transfected with indicated siRNAs. After 48 h, cells were stressed with arsenite for 30 min. Localization of ATXN2, ATXN2L, and DDX6 in stress granules was analyzed by immunofluorescence, using TIA1 as a stress granule marker. Scale bar: 10 μ m. (C) Components of the EJC were analyzed as in A.

The interactions with EJC proteins, PABPN1, and NCBP1 were confirmed by coimmunoprecipitation in untransfected cells (Figure 4C). The interactions with the EJC and NCBP1 were fully RNA mediated, while PABPN1 was partly RNA independent. These results raised the possibility that DDX6 binds mRNAs not only following translational repression but at the nuclear exit, before any translation. Nevertheless, in contrast to the repressors above, none of these proteins localized to P-bodies, except for a small amount of MLN51 (Supplemental Figure 1D).

Role of DDX6 partners in P-body maintenance

To rank DDX6 partners in terms of requirement for P-body maintenance, we compared the effect of silencing DDX6 and some of its main partners on P-bodies. HeLa cells were silenced for 48 h with

siRNA targeting DDX6 partners, including EDC3 and EDC4, PAT1B, 4E-T, LSM14A and LSM14B, and ATXN2 and ATXN2L. For each transfection, the silencing efficiency was confirmed by Western blot analysis (Figure 5A). In parallel, P-bodies were detected by immunostaining of EDC4 or DDX6, depending on the silenced protein and its antibody host species (Figure 5B). Silencing 4E-T or LSM14A suppressed P-bodies as efficiently as did silencing DDX6, in agreement with previous reports (Ferraiuolo *et al.*, 2005; Chu and Rana, 2006; Yang *et al.*, 2006). Depleting PAT1B led to a 50% decrease of P-body number (Figure 5C), as previously reported (Marnef *et al.*, 2010). The decrease after silencing EDC4 was only 24%, indicating a minor contribution of EDC4 to P-body assembly. This is in contradiction to a previous report (Yu *et al.*, 2005) and may be related to the use of different P-body markers. ATXN2L silencing reproducibly led to a

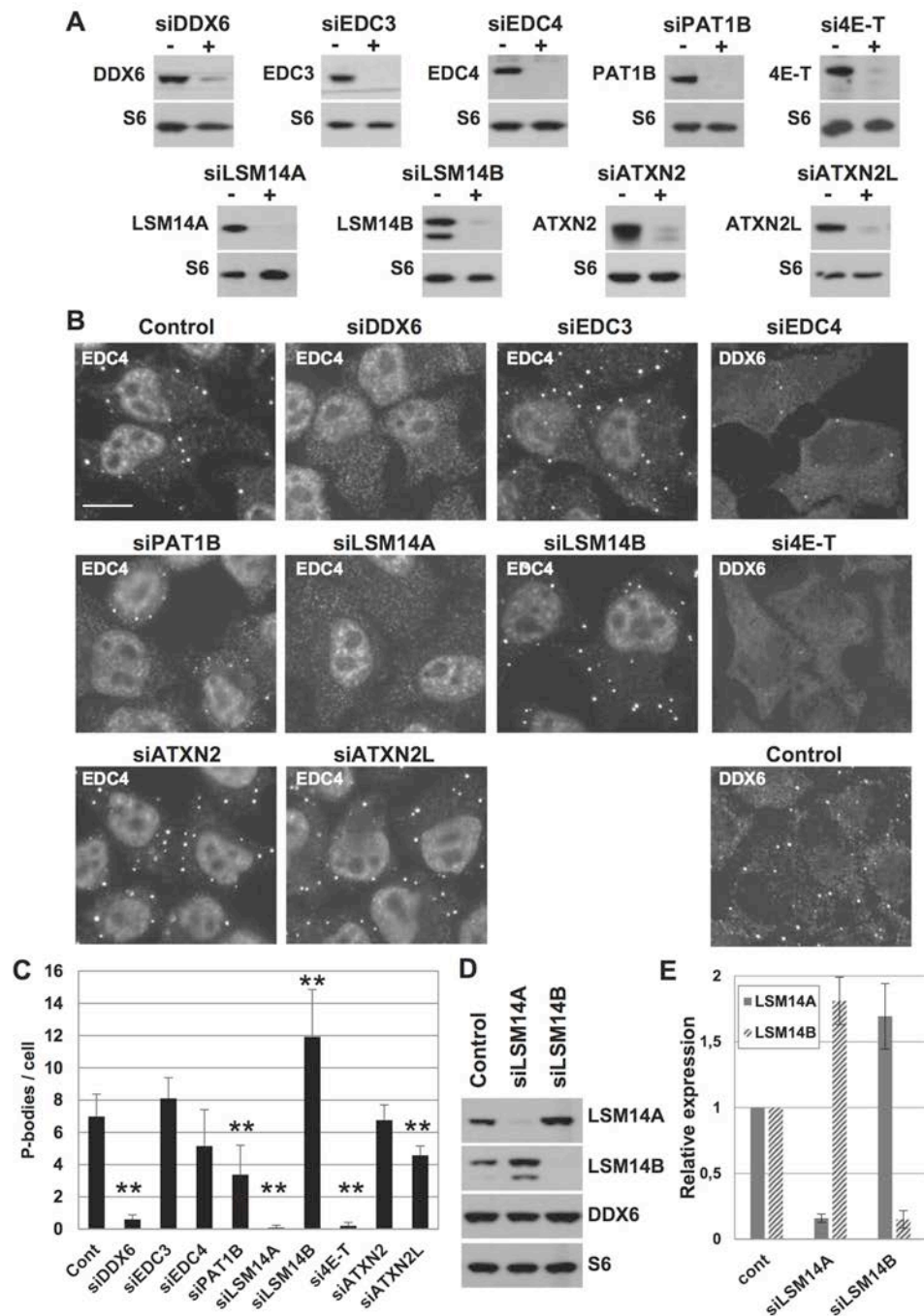


FIGURE 5: Role of P-body proteins in the maintenance of P-bodies. (A–C) HeLa cells were transfected with indicated siRNAs. After 48 h, (A) proteins were analyzed by Western blotting with indicated antibodies, and (B) P-bodies were analyzed by immunofluorescence with anti-EDC4 or DDX6 antibodies, along with antibodies directed against the silenced protein to check the silencing at the individual cell level (unpublished data). Scale bar: 10 μ m. (C) P-bodies were counted in three independent experiments, and their average number per cell was plotted. **, $p < 0.005$. (D and E) After transfection of siLSM14A and siLSM14B, proteins were analyzed by Western blotting using indicated antibodies (D). Signals were quantified in three independent experiments and plotted (E).

minor decrease, which was lower than previously reported (Kaehler et al., 2012), possibly due to the shorter silencing duration. Finally, silencing EDC3 and ATXN2 did not impact P-bodies, while depleting LSM14B even increased their number. The absence or decrease of P-bodies was confirmed by immunostaining of a second P-body marker, XRN1 (Supplemental Figure 2A). These results pointed to a major role of 4E-T and LSM14A along with DDX6 in the maintenance of P-bodies, and to an accessory role of PAT1B and EDC4.

In view of their strong homology and their similar localization in P-bodies, the opposite effect of silencing LSM14A and LSM14B was unexpected. When analyzing the efficiency of LSM14A and LSM14B silencing by Western blot, we observed a cross-regulation of the two proteins (Figure 5D). Silencing LSM14B led to an almost twofold increase of LSM14A protein, and conversely, depleting LSM14A enhanced expression of LSM14B (Figure 5E). This regulation did not extend to other P-body proteins such as DDX6 (Figure 5D). Thus the induction of P-bodies observed after LSM14B silencing could be the result of increasing LSM14A abundance.

LSM14A interacts directly with DDX6 through its FDF motif, and this interaction is prevented by a mutation of the FDF-binding pocket (Mut1; Tritschler et al., 2009). To determine whether this pocket was involved in P-body assembly, we used a complementation assay previously set up to demonstrate the requirement for DDX6 helicase motifs (Minshall et al., 2009). In the presence of endogenous DDX6, Mut1 DDX6 localized to P-bodies similar to the wild-type protein (Supplemental Figure 3A). When P-bodies were suppressed by siDDX6 transfection before plasmid transfection, Mut1 DDX6 was two times less potent than wild-type DDX6 at assembling P-bodies (Supplemental Figure 3B). Thus the Mut1 mutation partially impairs the capacity of DDX6 to assemble P-bodies. The FDF-binding pocket of DDX6 binds several ligands, including LSM14A, but also PAT1B and EDC3 (Tritschler et al., 2009; Sharif et al., 2013). As EDC3 was dispensable for P-bodies (Figure 5C), these results suggested that a direct interaction between DDX6 and LSM14A or PAT1B facilitated P-body assembly.

Role of DDX6 partners in de novo P-body assembly

We have shown previously that, besides being required for the maintenance of pre-existing P-bodies, DDX6 is also required for the induction of new P-bodies following arsenite treatment (Serman et al., 2007; Minshall et al., 2009). To address the same question for its partners, we transfected HeLa cells with various siRNAs and treated them with arsenite for 30 min to induce new P-bodies. The action of arsenite was controlled by immunostaining of ATXN2 (Supplemental Figure 2B). The silencing was efficiently maintained during arsenite treatment, as controlled by Western blotting (Supplemental Figure 2D). P-bodies were detected by immunostaining of EDC4 or LSM14A, depending on the silenced protein (Figure 6A). In control cells and in cells transfected with siRNAs targeting EDC3, arsenite treatment led to the doubling of P-body number (Figure 6, A and B, compared with Figure 5, B and C). The same was observed after PAT1B silencing, despite the decrease of P-bodies observed before arsenite addition. Thus PAT1B was dispensable for de novo P-body assembly. In contrast, silencing 4E-T prevented P-body reassembly, as did DDX6 depletion. Silencing EDC4 and LSM14A was partially inhibitory but with distinct outcomes. Normal-sized P-bodies still formed in the absence of EDC4 but not in the absence of LSM14A, as evidenced when quantitation was restricted to large P-bodies (Figure 6B). Overall these results indicated that DDX6, 4E-T, and, to a lesser extent, LSM14A were required for P-body assembly in response to arsenite, whereas PAT1B and EDC3 were dispensable, and EDC4 only facilitated assembly.

How arsenite induces P-bodies is unknown. As the drug drastically blocks translation, P-body induction may result from the substantial release of untranslated mRNAs. To investigate whether DDX6, 4E-T, and LSM14A are involved more generally in P-body assembly, we used inducers of different nature. Vinblastine is an antimicrotubule drug reported to induce P-body assembly (Aizer et al., 2008). Its action was controlled by monitoring the appearance of characteristic spiral aggregates of tubulin (Supplemental Figure 2C). In addition, we found that a mild cold shock at 30°C for 2 h is also a P-body inducer, as strong as vinblastine or arsenite treatment (Figure 7A). The three inducers were compared in terms of translation by analyzing polysomes on sucrose gradients (Figure 7B). In contrast to arsenite, vinblastine and 30°C had only moderate effects on polysomes, in agreement with previous reports (Dresios et al., 2005; Carbonaro et al., 2011). The silencing experiments described above were repeated using these new conditions, and the silencing efficiency was controlled by Western blot analysis (Supplemental Figure 2D). In both vinblastine and 30°C conditions, DDX6, 4E-T, and LSM14A were required for P-body induction (Figure 8). On vinblastine treatment, EDC4 facilitated P-body assembly, whereas PAT1B was dispensable. On mild cold shock, both EDC4 and PAT1B facilitated P-body assembly.

In conclusion, in all conditions, the assembly of new P-bodies required DDX6 and 4E-T. LSM14A was also required after vinblastine and 30°C treatments, while after arsenite, very small granules were still induced in its absence. In contrast, EDC3 was dispensable, and EDC4 only facilitated P-body assembly. The requirement for PAT1B depended on the inducer: dispensable after arsenite and vinblastine, it facilitated P-body assembly at 30°C. Overall proteins of the repression complex appeared to be more important for P-body assembly than cofactors of the decapping complex.

DISCUSSION

TAP-tag analysis highlighted the decapping, the CPEB-like, and the ATXN2/2L complexes

Characterization of the DDX6 interactome in human epithelial cells was a starting point to understand DDX6 requirement for P-body assembly. We found a high number of interacting proteins (more than 200) that should be looked at in relation to DDX6 abundance. We showed previously that DDX6 concentration is ~3.4 μM in HeLa cells and in a ~30-fold excess over its partner, EDC3 (Ernault-Lange et al., 2012). According to available quantitative proteomic data (Nagaraj et al., 2011), it is in excess over most of its partners (Supplemental Table 3), indicating the coexistence of a variety of DDX6 complexes. The top 20 partners included at least three groups of proteins belonging to the decapping complex, a CPEB-like repression complex, and an ATXN2/2L complex, which were confirmed in untransfected cells by coimmunoprecipitation with endogenous DDX6. Overall DDX6 interaction with the CPEB-like complex was partly RNA mediated, while interaction with proteins of the decapping complex and the ATXN2/2L complex was independent of RNA. While these RNA-independent interactions might correspond to complexes sitting on mRNAs as well as free in the cytosol, the increased EDC4 and PABPC1 association observed after RNA digestion suggests that these complexes are bound to RNA. Strikingly, a major fraction of EDC3 and DCP1A in the decapping complex and 4E-T in the CPEB-like complex was associated with DDX6.

When DDX6 was isolated from oocytes, it copurified with proteins of the CPEB1 complex, as expected from our previous studies (Minshall et al., 2007, 2009). Interestingly, also predicted was the absence of decapping enzymes, including Dcp2 and its cofactors Dcp1, Edc3, and Edc4, as decapping activity is undetectable in oocytes

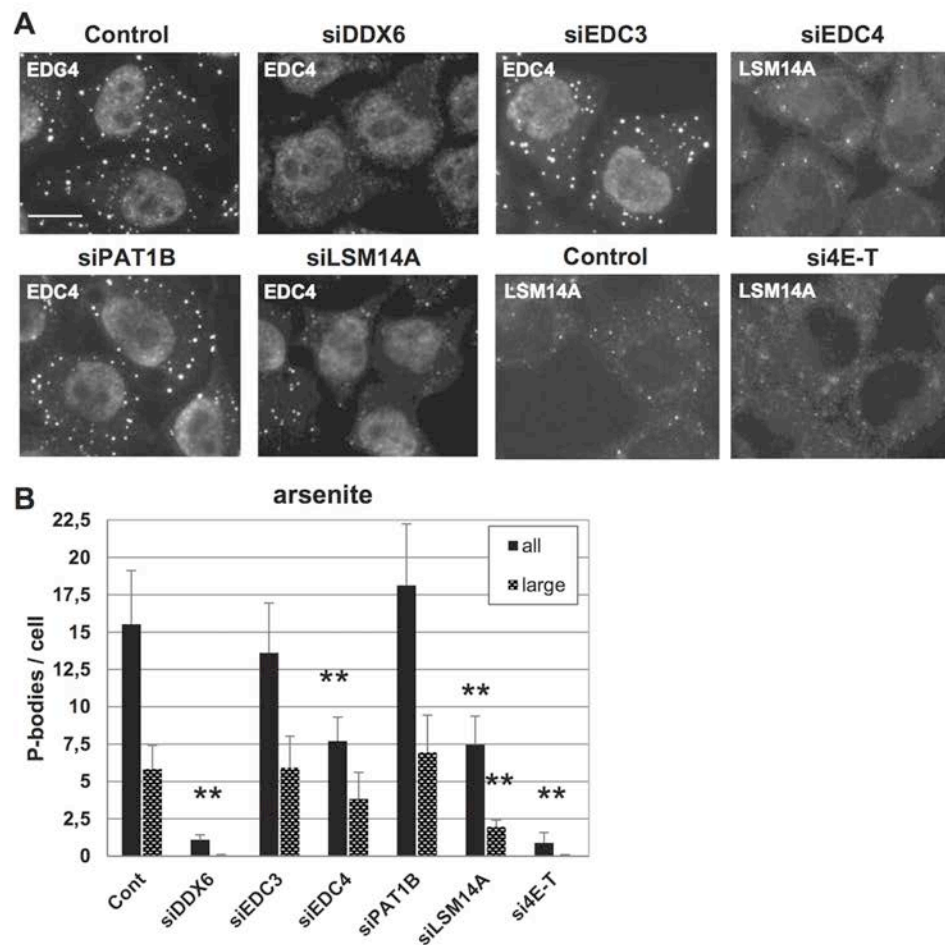


FIGURE 6: Role of P-body proteins in P-body assembly after arsenite treatment. HeLa cells were transfected with indicated siRNAs and analyzed as in Figure 5, except that cells were treated with arsenite for 30 min before fixation. P-bodies were immunostained (A) and counted (B) as in Figure 5 (all), except that LSM14A antibodies were used in place of DDX6, as this accumulated in both stress granules and P-bodies. A second quantitation restricted to P-bodies larger than 450 nm was performed to show the characteristic defect observed after silencing LSM14A (large). Scale bar: 10 μ m. The corresponding Western blot analysis is presented in Supplemental Figure 2D.

and only robustly observed in mid-embryogenesis as zygotic transcription is triggered (Gillian-Daniel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999), compatible with the long-term storage of oligoadenylated maternal mRNAs in oocytes. However, DDX6 pulled down the more recently described decapping enzyme Nudt16, raising the possibility that oocytes contain an inactive form of this enzyme bound to DDX6 to be activated following oocyte maturation and fertilization. A second major difference was the absence of the ATXN2/2L complex, though it expressed in the cells, suggesting that these proteins have a different function in oocytes that does not require DDX6.

For convenience, we described the decapping complex and the repressor complex as distinct. Crystal structures have revealed that some proteins of the two complexes bind DDX6 in a mutually exclusive manner. This is the case for LSM14A and EDC3 (Tritschler *et al.*, 2009) and EDC3 and PAT1B (Sharif *et al.*, 2013). Nevertheless, the capacity of DDX6 to oligomerize (Ernault-Lange *et al.*, 2012) raises the possibility that oligomers accommodate these

partners simultaneously. Moreover, some proteins like PAT1B have an uncertain status and might be shared between the two complexes. Finally, multiple DDX6 binding to repressed RNAs (Ernault-Lange *et al.*, 2012) should also allow loading of distinct complexes to the same mRNAs.

Furthermore, some DDX6 was also found on polysomes. While at first glance this seems to contradict a function in repression or decay, this observation is consistent with reports in yeast showing some polysomal DDX6 under diauxic growth shift conditions (Drummond *et al.*, 2011) or after mild cross-linking (Sweet *et al.*, 2012). The latter study concluded that DDX6 triggers cotranslational decapping. Nevertheless, the interpretation of the experiment may be more complex if DDX6 simultaneously participates in a variety of complexes of different function. For instance, its function in polysomes might be related to the ATXN2/2L complex rather than to the decapping complex, as ATXN2 too is associated with polysomes (Satterfield and Pallanck, 2006). After cycloheximide treatment, we

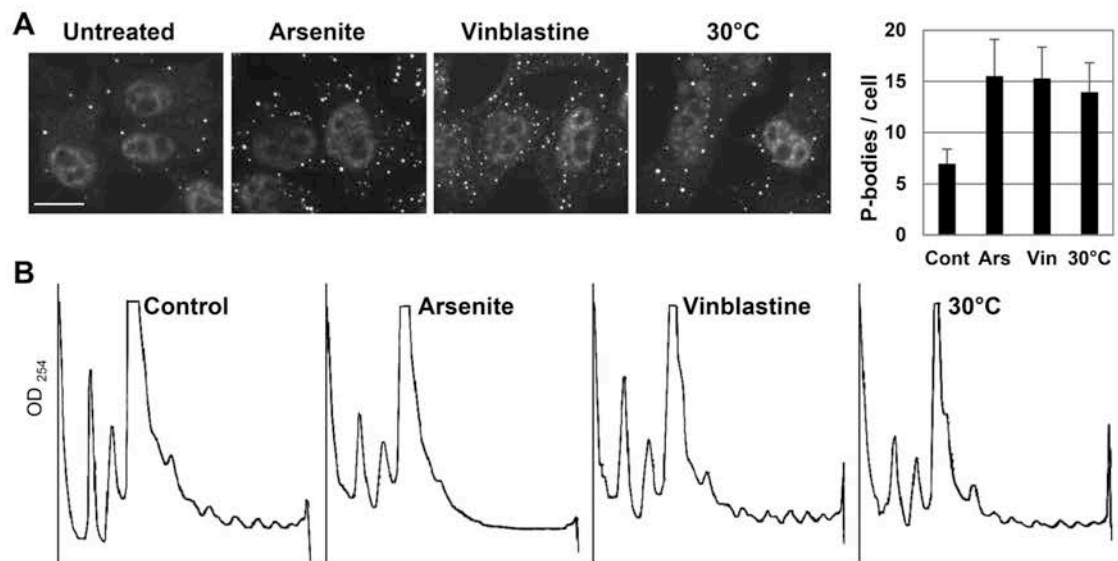


FIGURE 7: P-body induction after treatment with arsenite, vinblastine, and mild cold shock. HeLa cells were treated with arsenite for 30 min, vinblastine for 1 h, or cultured at 30°C for 2 h before lysis or fixation. (A) P-bodies were detected and counted as in Figure 5. Scale bar: 10 μ m. (B) Cytoplasmic lysates were separated on sucrose gradients and analyzed by optic densitometry, as in Figure 3C.

observed a striking accumulation of DDX6 in polysomes that was stronger than the accumulation of the polysomes themselves as monitored by optical density. Recently Presnyak *et al.* (2015) showed in yeast that the presence of suboptimal codons leads to mRNA destabilization in addition to slow translational elongation. They proposed that Dhh1/DDX6 could be the sensor for these inefficient polysomes. One interesting possibility would be that cycloheximide-arrested polysomes actively recruit DDX6 in the same manner as suboptimal codon-containing polysomes, leading to extra accumulation of DDX6 in the polysomal fractions.

Only some DDX6 complexes are targeted to P-bodies

We estimated that only 6% of DDX6 is localized in P-bodies (Souquere *et al.*, 2009; Ernoul-Lange *et al.*, 2012). This is nevertheless high compared with other P-body proteins such as Ago2 (1%; Leung and Sharp, 2013). As a consequence, the TAP-tag strategy identified complexes that are mostly cytosolic even if, like DDX6 itself, they can be targeted to P-bodies. In fact, while many of the top DDX6 partners were known components of P-bodies, including proteins of the decapping and CPEB-like complexes, some were excluded from P-bodies, like ATXN2, ATXN2L, and PABPs, demonstrating the existence of two types of DDX6 complexes, which differ by their capacity to be recruited in P-bodies.

The biological meaning of DDX6 interaction with ATXN2 and ATXN2L is unknown. Although their interaction was reported previously (Nonhoff *et al.*, 2007; Kaehler *et al.*, 2012), their top ranking in the mass spectrometry analysis was unexpected. ATXN2L is almost as abundant as DDX6 (Supplemental Table 3). In stressed cells, its silencing was sufficient to prevent DDX6 recruitment to stress granules, suggesting that an important fraction of the DDX6 protein distributed in the cytosol was engaged in ATXN2L complexes. Reciprocally, coimmunoprecipitation experiments indicated that an important fraction of ATXN2L was engaged in DDX6 complexes. Despite possible ATXN2-ATXN2L interactions (Kaehler *et al.*, 2012), ATXN2 silencing did not have a strong effect on DDX6 localization,

possibly reflecting its lower expression in the cells (sevenfold; Supplemental Table 3). In *Drosophila*, ATXN2 is required for optimal repression of several miRNA targets (McCann *et al.*, 2011) and is involved in long-term olfactory habituation via a mechanism depending on RISC and DDX6. Paradoxically, it also activates translation of the clock component PERIOD, but via a DDX6-independent mechanism (Lim and Allada, 2013; Zhang *et al.*, 2013). In our analysis, the RISC complex and the CCR4/NOT complex were almost absent. Yet, DDX6 interactions with AGO1, AGO2, and NOT1 and their functional consequence on the miRNA pathway have been demonstrated by others (Chu and Rana, 2006; Chen *et al.*, 2014; Mathys *et al.*, 2014; Rouya *et al.*, 2014). Again, their absence in our experiment is likely to result from their lower expression compared with DDX6 (50-fold for AGO proteins, 500-fold for NOT1; Supplemental Table 3). Any such interactions would be diluted by the most abundant decay and CPEB-like and ATXN2/2L complexes. Finally, if the DDX6/ATXN2/2L complex is involved in miRNA-mediated repression, it clearly dissociates before repressed mRNAs enter P-bodies. Most models schematizing the role of DDX6 in mRNA metabolism represent translational repression and mRNA decay downstream of translation, seemingly in contradiction to the presence of the EJC and the nuclear cap and poly(A)-binding proteins among DDX6 partners reported here. As these interactions were fully RNA mediated, they are probably not involved in the recruitment of DDX6 to the RNA. Nevertheless, these interactions indicated that DDX6 can also bind mRNAs at their exit from the nucleus, before the first round of translation. In germ cells, the extensive storage of maternal mRNAs most likely precedes their translation. Some repressed mRNAs are stored in DDX6-containing germ granules that are associated with nuclear pores, such as human chromatoid bodies (Nagamori and Sassone-Corsi, 2008), *Drosophila* sponge bodies (Snee and Macdonald, 2009), and *C. elegans* P-granules (Pitt *et al.*, 2000). In HEK293 cells, however, the EJC is not found in P-bodies, suggesting that these mRNAs stored outside of P-bodies or rapidly enter translation.

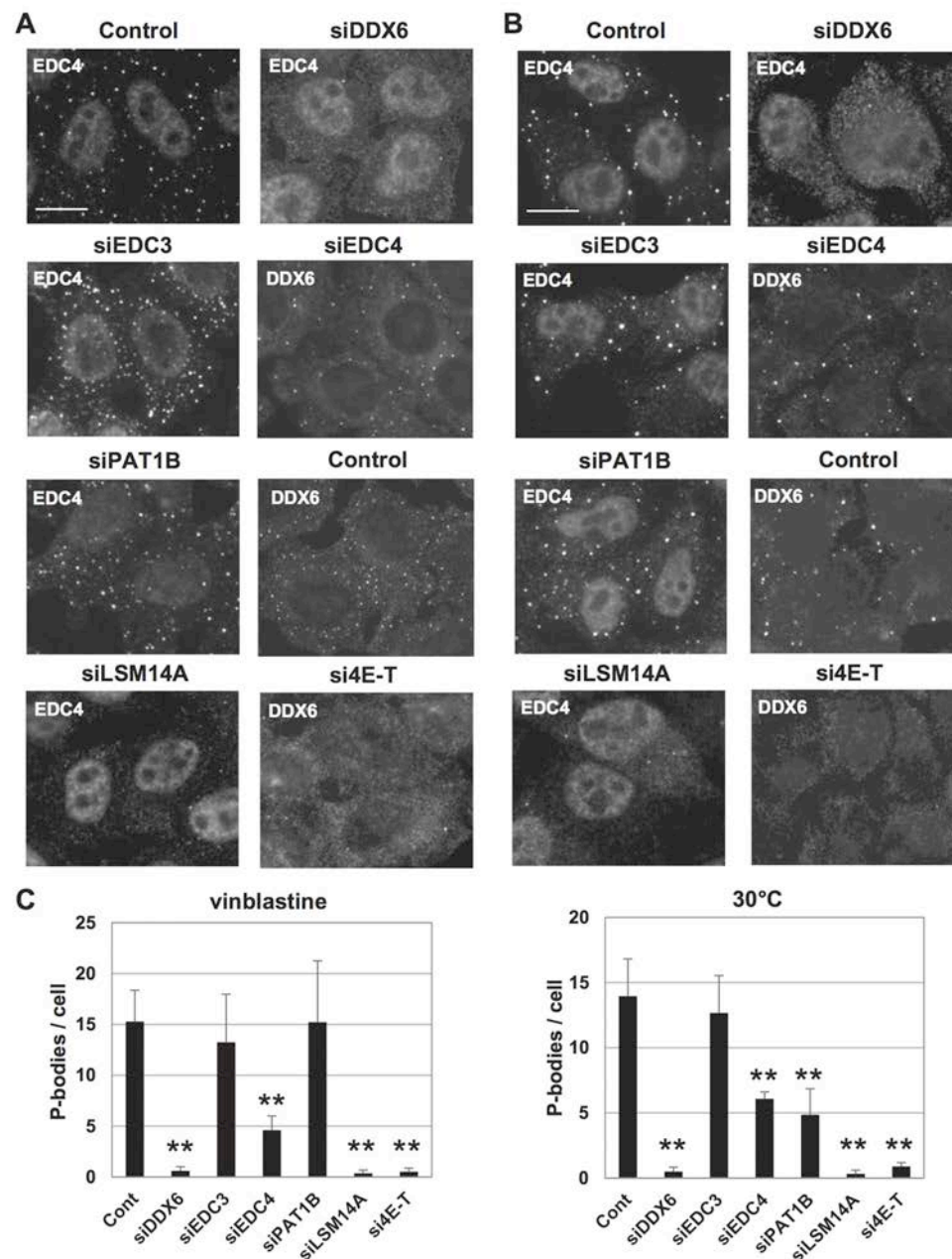


FIGURE 8: Role of P-body proteins in P-body assembly after vinblastine treatment and mild cold shock. HeLa cells were transfected with indicated siRNAs and analyzed, as in Figure 5, except that cells were treated with vinblastine (A) or cultured at 30°C (B) before fixation. P-bodies were counted as in Figure 5 (C). Scale bar: 10 μ m. The corresponding Western blot analysis is presented in Supplemental Figure 2D.

Various pathways sharing common factors for P-body assembly

Studies on P-body assembly have been quite confusing so far. First, little attention has been given to partial versus complete requirements. Then, a puzzling observation was that proteins required at first instance for maintaining P-bodies can be fully

dispensable upon treatments that induce P-bodies (Serman *et al.*, 2007). As the latter was observed only using an aggressive drug, arsenite, we studied two additional inducers that decreased polyosomes only partially, vinblastine, previously used by others (Aizer *et al.*, 2008), and a mild cold shock at 30°C, newly reported in this study. The ATXN2/2L complex did not seem to participate directly

in P-body assembly, although overexpressed ATXN2 and ATXN2L was previously shown to indirectly modulate P-bodies by sequestration of DDX6 out of P-bodies (Sweet *et al.*, 2012). The decapping complex also had a minor role compared with DDX6, with no influence of EDC3, as previously found for the decapping enzyme DCP2 itself (Andrei *et al.*, 2005), and a partial requirement for EDC4, which was stronger after arsenite or mild cold shock than after vinblastine. In contrast, three proteins of the CPEB-like complex were necessary to assemble P-bodies in all tested conditions: DDX6, 4E-T, and, to a lesser extent, LSM14A. Indeed, in its absence, tiny P-bodies still formed after arsenite treatment. However, not all components of the CPEB-like complex had such strong effects. PAT1B depletion led to only a partial defect and only in untreated cells or after cold shock, while LSM14B was fully dispensable. Consistently, interfering with the interaction between DDX6 and proteins of the CPEB complex, including LSM14A and PAT1B, impaired P-body assembly. Finally, Lsm14B silencing even induced P-bodies, possibly due to LSM14A up-regulation. While LSM14 has evolved into two paralogues in vertebrates, little is known about their respective function. In *Xenopus* oocytes, both Lsm14B and Lsm14A are expressed, but only Lsm14B is associated with the CPEB complex (Minshall *et al.*, 2007). In human cells, both were found with similar scores in DDX6 complexes, but only LSM14A is required for P-body assembly.

In summary, we undertook the first comprehensive proteomic study of the important regulatory DDX6 helicase and assessed the role of its interacting partners in P-body assembly. The three identified master genes required for P-body formation in human cells are components of the CPEB-like complex, suggesting that P-body assembly is the result of repressing mRNAs rather than targeting them for decay. Importantly, P-body assembly follows a different pathway in lower eukaryotes. In yeast, it requires limited growth conditions, and DDX6 is dispensable (Teixeira and Parker, 2007), while 4E-T is absent. In human cells, some bona fide P-body proteins, like EDC3 and LSM14B, seem to follow repressed mRNAs passively into P-bodies. Others, like PAT1B and EDC4, participate in P-body assembly only in specific conditions, which most likely reflect the existence of distinct repression pathways. The puzzling differential requirement of some proteins for P-body maintenance and P-body induction, observed here for PAT1B and previously for CPEB1 and GW182 (Serman *et al.*, 2007), may simply reflect such different repression pathways. In contrast, DDX6, 4E-T, and LSM14A, as common factors of all pathways, are excellent candidates to serve as scaffolds during assembly. Indeed, we demonstrated previously that DDX6 has self-oligomerization properties (Ernault-Lange *et al.*, 2012), and 4E-T and LSM14A have extensive conserved disordered regions that could participate in supramolecular aggregation.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney HEK293 and epithelioid carcinoma HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. For P-body induction, cells were cultured with 0.5 mM arsenite (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 30 min, 10 μ M of vinblastine (Sigma-Aldrich) for 1 h, or at 30°C for 2 h.

HEK293 cells were chosen for tandem-affinity purification because of their high transfection efficiency (close to 90% in our conditions). Cells were transfected with 45 μ g plasmid DNA per 150-mm-diameter dish using a standard calcium phosphate procedure. Human DDX6 open reading frame (ORF) was subcloned into pcDNA3-FLAG vector (*Bam*HI/*Not*I restriction sites) so that FLAG is upstream and in-frame with DDX6. The HA tag was then introduced

downstream and in-frame with DDX6 ORF, using the In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France).

Because of HEK293's round morphology, HeLa cells were preferred for P-body imaging following silencing. Cells were transfected at the time of their plating (reverse transfection) with 1.5 μ g siRNA (Eurofins, Ebersberg, Germany) per 35-mm-diameter dish using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Saint-Aubin, France) and split in two 20 h later. At 48 h after transfection, cells were fixed for immunofluorescence or harvested for protein preparation.

The siRNA sequences were as follows: si4E-T AGACUCUU-CUCCACUACAdTdT; siATXN2 GGAACCGAAAGGCCAAAU-UdTdT; siATXN2L CUUCAACUAGCUACUAAAdTdT; siDDX6, GGAACUAGAAGACUUAAdTdT; siEDC3 UCAGGCAACUCCCAAGAAAdTdT; siEDC4 UGAGCAAAGUGACCAUGAUdTdT; siLSM14A, UCAUGGUCCUGAACAUUGAdTdT; siLSM14B CUACUGAAGUGCGCAUAAAdTdT; siPAT1B CUAGAAGAUCCAGCUAU-UdTdT.

The complementation assay was performed as described previously (Minshall *et al.*, 2009).

Immunoprecipitation and Western blot analysis

Cytoplasmic proteins were extracted as described previously (Ernault-Lange *et al.*, 2008). Proteins were separated on a NuPage 4–12% gel (Invitrogen, Life Technologies) and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). After blocking in PBS-T (phosphate-buffered saline [PBS], 0.1% Tween-20) containing 5% (wt/vol) nonfat dry milk for 1 h at room temperature, the membrane was incubated with the primary antibody for 1 h at 37°C, rinsed in PBS-T, and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 h at room temperature. After washing in PBS-T, immune complexes were detected using the Supersignal West Pico Chemiluminescent Signal kit (Pierce, Life Technologies) and visualized by exposure to CL-XPosure film (Pierce).

Primary antibodies included mouse ATXN2 and G3BP from BD Biosciences; rabbit ATXN2L from Bethyl; goat TIA1 and mouse EDC4, eIF4E, and XRN1 from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany); goat 4E-T and rabbit LSM12 from Abcam (Paris, France); rabbit LSM14A and mouse PABPC1 from Merck-Millipore (Molsheim, France); rabbit LSM14B and mouse α -tubulin from Sigma-Aldrich; rabbit DDX6 from Novus Biologicals (Bio Techne, Lille, France); and rabbit ribosomal S6 from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Rabbit DCP1A antibody was a kind gift from B. Seraphin (IGBMC, Strasbourg, France), rabbit EDC3 from J. Lykke-Andersen (University of California, San Diego), rabbit PABPN1 from C. Trollet (Institut de Myologie, Paris, France), rabbit PAT1B from N. Standard (University of Cambridge, UK), rabbit eIF4A3 and Y14 from H. le Hir (ENS, Paris, France; Saulière *et al.*, 2012), rabbit MLN51 from C. Tomassetto (IGBMC, Strasbourg, France), and rabbit NCBP1 from E. Izaurralde (MPI, Tuebingen). The secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Suffolk, UK).

For immunoprecipitations, 2–5 mg of the cytoplasmic extracts was incubated at 4°C for 1 h with 0.5–1.5 μ g anti-DDX6 antibodies in lysis buffer (without NP-40). Twenty-five microliters of a 50% slurry of protein A Sepharose (Sigma-Aldrich) was added. After 2 h at 4°C with constant rotation, beads were washed, and associated proteins were eluted in SDS sample buffer. For the EJC proteins, Dynabeads protein A magnetic beads (Life Technologies) were used in place of protein A Sepharose. Immunoprecipitated proteins were migrated along with 15 or 30 μ g cytoplasmic lysate. For estimating the fraction of each protein which was immunoprecipitated, signals were

quantified from scanned X-ray films using Quantity One software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), standardized for the amount of input and immunoprecipitated proteins loaded on the gel, and expressed as a percentage of DDX6 immunoprecipitated in the same experiment.

Immunofluorescence

Cells grown on glass coverslips were fixed in methanol for 3 min at -20°C . After rehydration, cells were incubated with the primary antibody for 1 h, rinsed with PBS, incubated with the fluorochrome-conjugated secondary antibody for 45 min, and rinsed with PBS, all steps being performed at room temperature. Slides were mounted in Citifluor (Citifluor, London, UK). Microscopy was performed on a Leica DMR microscope (Leica, Heidelberg, Germany) using a 63×1.32 oil-immersion objective. Photographs were taken using a Micromax CCD camera (Princeton Scientific Instruments, Monmouth Junction, NJ) driven by MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Images were processed with ImageJ. For the calculation of DDX6 enrichment in P-bodies, a line was drawn across individual P-bodies, and intensity along this line was plotted using ImageJ software. To quantitate P-bodies, we used the plug-in Spot Detector of the open bioimage informatics platform Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org>; de Chaumont et al., 2012), with a size filtering of 250 and 450 nm for all P-bodies and large P-bodies, respectively.

For Supplemental Figure 3, confocal microscopy was performed on a Leica TCS SP5 inverted confocal microscope (Leica) using an Apochromat 63×1.40 oil-immersion objective. Fluorescence signals were acquired in $0.13\text{-}\mu\text{m}$ optical sections. Maximal projections were obtained using ImageJ.

Tandem-affinity purification and mass spectrometry

HEK293 cells were lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, and 1 mM dithiothreitol (DTT), supplemented with a protease inhibitor cocktail without EDTA (Roche Diagnostics, Meylan, France), for 30 min on ice, in the presence of either 65 U/ml RNaseOut recombinant ribonuclease inhibitor (Promega) or 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A (Euromedex). Nuclei and cytoplasm were separated by centrifugation at $500 \times g$ for 10 min at 4°C . Cytoplasmic proteins were quantified by the Coomassie protein assay (Thermo Scientific). Thirty-five milligrams of proteins was mixed with 120 μl of 50% slurry control agarose resin (Thermo Scientific, Life Technologies) to eliminate resin-binding proteins. Cleared extracts were then incubated with 120 μl of 50% slurry of the anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) for 2 h at 4°C . After beads were washed in the lysis buffer lacking NP-40, bound complexes were eluted in 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of M2 peptide (Sigma-Aldrich) for 1 h at 4°C . Complexes were then incubated overnight with 120 μl of 50% slurry of the monoclonal anti-HA agarose (Sigma-Aldrich). After beads were washed, bound proteins were eluted in Laemmli SDS sample buffer. One-tenth of each sample was separated on a Nu-PAGE 4%–12% Bis-Tris gel and stained with the Pierce Silver stain kit (Thermo Scientific). The remainder was briefly migrated on a Nu-PAGE 4%–12% Bis-Tris gel and stained with SimplyBlue SafeStain (Life Technologies). Each lane was cut into six slices, which were processed for liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis in the Cambridge Center for Proteomics, at the University of Cambridge (UK). A Mascot search algorithm (Matrix Science, London, UK) was used to search against the UniProt human database using a fixed modification of carbamidomethyl (C), a variable modification of oxidation (M), and a peptide tolerance of 25 ppm.

Mass spectrometry of *Xenopus* oocyte DDX6 immunoprecipitates

MS2-FLAG-tagged DDX6 mRNA and control MS2-FLAG mRNA was in vitro transcribed as described previously (Minshall et al., 2009; Ernault-Lange et al., 2012), and 50 nl (at 500 ng/ μl) was injected into each stage VI oocyte. Approximately 800 oocytes were injected with control mRNA and 1600 with DDX6 mRNA. After 36 h at 18°C , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (final) progesterone was added to 800 of DDX6 mRNA-injected oocytes to induce meiotic maturation, and lysates from the three sets were prepared at 48-h postinjection. Extracts were made by addition of 6 ml NET buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% gelatin, 0.02% NaN_3) and clarification by centrifugation at $10,000 \times g$, 2×10 min, 4°C . S10 was bound to 80 μl protein G Sepharose and 8 μl mouse anti-FLAG antibody (Sigma Aldrich) overnight at 4°C . After washing, bound proteins were eluted with $2 \times 400 \mu\text{l}$ 0.1% TBS plus 100 ng/ μl 3 \times FLAG peptide (Sigma-Aldrich) for 2 h at 4°C . Following concentration, samples were briefly electrophoresed into a 15% SDS–PAGE gel, and several slices from each lane were trypsin digested and analyzed by LC-MS/MS in the Cambridge Centre for Proteomics. Peptides were assessed against merged *Xenopus laevis* and *tropicalis* databases.

Polysome gradients

Cells were harvested in ice-cold PBS and lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40), supplemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 65 U/ml of RNaseOut ribonuclease inhibitor (Promega), for 5 min. After centrifugation at $500 \times g$ for 5 min to eliminate nuclei, supernatants were layered onto 10–50% sucrose gradients in polyribosome buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 2 mM DTT) and centrifuged at 39,000 rpm for 2.75 h at 4°C in a Beckman SW41-Ti rotor. Optical density at 254 nm was monitored using a density gradient fractionator (Teledyne Isco, Lincoln, NE).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Sylvie Souquère and Gérard Pierron for their kind gift of an immunoelectron microscopy image of HEK293 cells. J.A. was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, a CNRS PICS grant, and Agence Nationale pour la Recherche contract ANR-14-CE09-0013-01. This work was also supported by the Wellcome Trust (084885/Z/08/Z to N.S.).

REFERENCES

- Aizer A, Brody Y, Ler LW, Sonenberg N, Singer RH, Shav-Tal Y (2008). The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell* 19, 4154–4166.
- Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11, 717–727.
- Buchan JR (2014). mRNP granules: assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol* e29034.
- Carbonaro M, O'Brate A, Giannakakou P (2011). Microtubule disruption targets HIF-1 α mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *J Cell Biol* 192, 83–99.
- Chen Y, Boland A, Kuzuoğlu-Öztürk D, Bawankar P, Loh B, Chang C-T, Weichenrieder O, Izaurralde E (2014). A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol Cell* 54, 737–750.
- Chu C, Rana TM (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4, e210.
- Collier J, Parker R (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122, 875–886.

- Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7, 1717–1727.
- De Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, et al. (2012). ICY: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* 9, 690–696.
- Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP (2005). Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1865–1870.
- Drummond SP, Hildyard J, Firczuk H, Reamtong O, Li N, Kannambath S, Claydon AJ, Beynon RJ, Eyers CE, McCarthy JEG (2011). Diauxic shift-dependent relocation of decapping activators Dhh1 and Pat1 to polysomal complexes. *Nucleic Acids Res* 39, 7764–7774.
- Ernault-Lange M, Baconnais S, Harper M, Minshall N, Souquere S, Boudier T, Bénard M, Andrey P, Pierron G, Kress M, et al. (2012). Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein Rck/p54. *RNA* 18, 1702–1715.
- Ernault-Lange M, Wilczynska A, Harper M, Aigueperse C, Dautry F, Kress M, Weil D (2008). Nucleocytoplasmic traffic of CPEB1 and accumulation in Crm1-nucleolar-bodies. *Mol Biol Cell* 20, 176–187.
- Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol* 170, 913–924.
- Ghosh T, Peterson B, Tomasevic N, Peculis BA (2004). *Xenopus* U8 snoRNA binding protein is a conserved nuclear decapping enzyme. *Mol Cell* 13, 817–828.
- Gillian-Daniel DL, Gray NK, Aström J, Barkoff A, Wickens M (1998). Modifications of the 5' cap of mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation: independence from changes in poly(A) length and impact on translation. *Mol Cell Biol* 18, 6152–6163.
- Haas G, Braun JE, Igreja C, Tritschler F, Nishihara T, Izaurralde E (2010). HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. *J Cell Biol* 189, 289–302.
- Holmes LEA, Campbell SG, De Long SK, Sachs AB, Ashe MP (2004). Loss of translational control in yeast compromised for the major mRNA decay pathway. *Mol Cell Biol* 24, 2998–3010.
- Holt CE, Schuman EM (2013). The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron* 80, 648–657.
- Kaehler C, Isensee J, Nonhoff U, Terrey M, Hucho T, Lehrach H, Krobisch S (2012). Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies. *PLoS One* 7, e50134.
- Kamenska A, Lu W-T, Kubacka D, Broomhead H, Minshall N, Bushell M, Standart N (2014). Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Res* 42, 3298–3313.
- Leung AKL, Sharp PA (2013). Quantifying argonaute proteins in and out of GW/P-bodies: implications in microRNA activities. In: *Ten Years of Progress in GW/P Body Research*, ed. EKL Chan and MJ Fritzler, New York: Springer, 165–182.
- Lim C, Allada R (2013). ATAXIN-2 Activates PERIOD translation to sustain circadian rhythms in *Drosophila*. *Science* 340, 875–879.
- Liu C, Zhang X, Huang F, Yang B, Li J, Liu B, Luo H, Zhang P, Zhang H (2012). APOBEC3G inhibits microRNA-mediated repression of translation by interfering with the interaction between Argonaute-2 and MOV10. *J Biol Chem* 287, 29373–29383.
- Marnef A, Maldonado M, Bugaut A, Balasubramanian S, Kress M, Weil D, Standart N (2010). Distinct functions of maternal and somatic Pat1 protein paralogs. *RNA* 16, 2094–2107.
- Mathys H, Basquin J, Ozgur S, Czarnocki-Cieciura M, Bonneau F, Aartse A, Dziembowski A, Nowotny M, Conti E, Filipowicz W (2014). Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Mol Cell* 54, 751–765.
- McCann C, Holohan EE, Das S, Dervan A, Larkin A, Lee JA, Rodrigues V, Parker R, Ramaswami M (2011). The Ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, E655–E662.
- Minshall N, Kress M, Weil D, Standart N (2009). Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. *Mol Biol Cell* 20, 2464–2472.
- Minshall N, Reiter MH, Weil D, Standart N (2007). CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 282, 37389–37401.
- Morita M, Ler LW, Fabian MR, Siddiqui N, Mullin M, Henderson VC, Alain T, Fonseca BD, Karashchuk G, Bennett CF, et al. (2012). A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol* 32, 3585–3593.
- Nagamori I, Sassone-Corsi P (2008). The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway. *Cell Cycle* 7, 3503–3508.
- Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M (2011). Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol* 7, 548.
- Nonhoff U, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo M-L, Lehrach H, Krobisch S (2007). Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Mol Biol Cell* 18, 1385–1396.
- Ozgun S, Chekulaeva M, Stoecklin G (2010). Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. *Mol Cell Biol* 30, 4308–4323.
- Pitt JN, Schisa JA, Priess JR (2000). P granules in the germ cells of *Caenorhabditis elegans* adults are associated with clusters of nuclear pores and contain RNA. *Dev Biol* 219, 315–333.
- Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, Olson S, Weinberg D, Baker KE, Graveley BR, et al. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160, 1111–1124.
- Rouya C, Siddiqui N, Morita M, Duchaine TF, Fabian MR, Sonenberg N (2014). Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* 20, 1398–1409.
- Satterfield TF, Pallanck LJ (2006). Ataxin-2 and its *Drosophila* homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet* 15, 2523–2532.
- Saulière J, Murigneux V, Wang Z, Marqueten E, Barbosa I, Le Tonquèze O, Audic Y, Paillard L, Roest Crolius H, Le Hir H (2012). CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1124–1131.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.
- Serman A, Le Roy F, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2007). GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res* 35, 4715–4727.
- Sharif H, Ozgur S, Sharma K, Basquin C, Urlaub H, Conti E (2013). Structural analysis of the yeast Dhh1-Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions. *Nucleic Acids Res* 41, 8377–8390.
- Snee MJ, Macdonald PM (2009). Dynamic organization and plasticity of sponge bodies. *Dev Dyn* 238, 918–930.
- Souquere S, Mollet S, Kress M, Dautry F, Pierron G, Weil D (2009). Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci* 122, 3619–3626.
- Sweet T, Kovalak C, Coller J (2012). The DEAD-box protein Dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. *PLoS Biol* 10, e1001342.
- Teixeira D, Parker R (2007). Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 2274–2287.
- Tritschler F, Braun JE, Eulalio A, Truffault V, Izaurralde E, Weichenrieder O (2009). Structural basis for the mutually exclusive anchoring of P body components EDC3 and Tral to the DEAD box protein DDX6/Me31B. *Mol Cell* 33, 661–668.
- Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci* 118, 981–992.
- Wühr M, Freeman RM, Presler M, Horb ME, Peshkin L, Gygi SP, Kirschner MW (2014). Deep proteomics of the *Xenopus laevis* egg using an mRNA-derived reference database. *Curr Biol* 24, 1467–1475.
- Yang W-H, Yu JH, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* 12, 547–554.
- Yang Z, Jakymiw A, Wood MR, Eystathioy T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK L (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci* 117, 5567–5578.
- Yu JH, Yang W-H, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* 11, 1795–1802.
- Zhang S, Williams CJ, Wormington M, Stevens A, Peltz SW (1999). Monitoring mRNA decapping activity. *Methods* 17, 46–51.
- Zhang Y, Ling J, Yuan C, Dubruielle R, Emery P (2013). A role for *Drosophila* ATX2 in activation of PER translation and circadian behavior. *Science* 340, 879–882.

Annexe 2 : Tableau des protéines identifiées avec les 20 meilleurs scores

dans la première analyse de spectrométrie de masse (MS1)

	+ Inhibiteur de RNases	+ RNase A	Fonctions
	Score	Score	
ATXN2L	2305	3230	Répression
ATXN2	2127	3047	Répression
EDC4	1043	2904	Décoiffage
PABPC4	2360	2603	PolyA binding
UPF1	2435	125	NMD
PABPC1	2359	2431	PolyA binding
4E-T	2325	646	Répression
HSPA1A	1807	2255	Chaperon
DCP1A	1974	2243	Décoiffage
EDC3	2194	2235	Décoiffage
DHX30	2205	--	?
NUFIP2	1698	2165	Répression
PATL1	2083	1490	Répression
DDX6	2079	1991	Répression, dégradation, ARN interférence
DCP1B	1807	2067	Décoiffage
DHX9	2032	--	Répression
HELZ	--	2022	Translation
GIGYF2	224	1870	Répression
HSPA8	1356	1836	Chaperon
LSM14B	1811	1709	Répression
LARP1	1446	1766	Translation
HSPA9	857	1766	Chaperon
MOV10	1658	168	Répression
YTHDC2	1611	29	
LSM14A	1578	1342	Répression
PRMT5	544	1531	Modifications post- transcriptionnelles
G3BP2	955	1417	?

Annexe 3 : Tableau des protéines identifiées avec les 20 meilleurs scores

dans la deuxième analyse de spectrométrie de masse (MS2)

	Mitose	Asynchrone	Fonctions
	Score	Score	
ATXN2L	2315	2283	Répression
PABPC1	2137	2142	PolyA binding
NUFIP2	2113	2001	Répression
EDC3	2052	2064	Décoiffage
PABPC4	1972	1839	PolyA binding
DDX6	1813	1910	Répression, dégradation, ARN interférence
DCP1A	1732	1723	Décoiffage
DCP1B	1566	1715	Décoiffage
UPF1	1580	1304	NMD
LSM14B	1570	1393	Répression
ATXN2	1558	1570	Répression
HEL113	--	1258	Epididymis luminal protein 113
HSPA1A	1481	1419	Chaperon
DHX30	1306	1017	?
4E-T	1075	868	Répression
LSM14A	1072	1176	Répression
IGF2BP1	1017	958	RNA-binding
HSPA8	933	784	Chaperon
ACTB	--	750	Actine
PATL1	862	811	Répression
G3BP2	834	744	?
IGF2BP3	763	480	RNA-binding